

ALINE DE CRISTO SOARES ALVES

**DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS DE PLGA E PLGA REVESTIDAS
COM POLISSORBATO 80 CONTENDO ÁCIDO GÁLICO**

GUARAPUAVA

2015

ALINE DE CRISTO SOARES ALVES

**DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS DE PLGA E PLGA REVESTIDAS
COM POLISSORBATO 80 CONTENDO ÁCIDO GÁLICO**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia, UNICENTRO-PR.

Orientador: Prof. Dr. Najeh Maissar Khalil.

GUARAPUAVA

2015

Catálogo na Publicação
Biblioteca Central da Unicentro, Campus Cedeteg

A474d Alves, Aline de Cristo Soares
Desenvolvimento de nanopartículas de PLGA e PLGA revestidas com polissorbato 80 contendo ácido gálico / Aline de Cristo Soares Alves. – – Guarapuava, 2015
xv, 96 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração em Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia, 2015

Orientador: Najeh Maissar Khalil
Banca examinadora: Najeh Maissar Khalil, Larissa Sakis Bernardi, Paulo César Ghedini

Bibliografia

1. Ciências farmacêuticas. 2. Nanopartículas. 3. Ácido gálico. 4. Polissorbato 80. 5. Antioxidante. I. Título. II. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

CDD 615



Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

Associação Ampla entre a
Universidade Estadual do Centro-Oeste e a
Universidade Estadual de Ponta Grossa



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº 03/2015

Ata de Defesa de Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas da pós-graduanda Aline de Cristo Soares Alves Associação Ampla entre a Universidade Estadual do Centro-Oeste, UNICENTRO e Universidade Estadual de Ponta Grossa, UEPG.

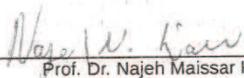
Aos vinte e três dias do mês de fevereiro do ano de dois mil e quinze, às 08:30 horas, na sala de aula do Programa de Pós Graduação – Mestrado em Ciências Farmacêuticas do *Campus* do CEDETEG, sob a presidência do Prof. Dr. Najeh Maissar Khalil, reuniu-se a Banca Examinadora da Defesa de Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas da pós-graduanda **Aline de Cristo Soares Alves**, constituída pelos professores: Prof. Dr. Najeh Maissar Khalil (orientador) - UNICENTRO, Profa. Dra. Larissa Sakis Bernardi (Membro titular) – UNICENTRO e Prof. Dr. Paulo César Ghedini (Membro titular) – UFG. Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da Banca e à candidata das normas que regem a defesa de Dissertação e definiu-se a ordem a ser seguida pelos examinadores para a arguição. A seguir, a candidata passou à defesa de sua Dissertação de Mestrado intitulada: "*Desenvolvimento de Nanopartículas de PLGA e PLGA Revestidas com Polissorbato 80 Contendo Ácido Gálico*". Encerrada a defesa, procedeu-se ao julgamento, tendo sido a candidata Homologada. A Presidência ressaltou que a obtenção Título de MESTRE EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de concentração em Fármacos, Medicamentos e Biociências aplicadas à Farmácia está condicionada ao depósito da versão definitiva (impressa) da Dissertação, bem como das cópias em CD (PDF), com todas as correções feitas e atestadas pelo orientador no prazo de trinta dias. O não atendimento ao prazo anulará toda possibilidade de outorga definitiva do Título, recebimento de Certidão e outros documentos, bem como a solicitação do Diploma. Esta Ata de Defesa deverá ser homologada pelo Colegiado do Programa e o título obtido deverá ser homologado pelo Comitê de Pós-Graduação *Stricto Sensu*, CPS. Nada mais havendo a tratar foi lavrada esta Ata e assinada pelos membros da Comissão Examinadora. Guarapuava, 23 de fevereiro de 2015.

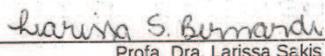
Observação (se necessário): _____

Alteração de Título:

Sim Não

Novo título: _____


Prof. Dr. Najeh Maissar Khalil,
UNICENTRO
Presidente


Profa. Dra. Larissa Sakis Bernardi,
UNICENTRO
Membro Titular


Prof. Dr. Paulo César Ghedini,
UFG
Membro Titular

- Ata de Defesa homologada pelo Colegiado do PPGCF, conforme Ata da Reunião nº _____, de ____/____/____.
- Título homologado pela CPS, conforme Resolução nº _____, de ____/____/____.

Este documento não substitui o diploma.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

Madre Teresa de Calcutá

DEDICATÓRIA

“Dedico este trabalho aos meus pais e meu irmão pelo apoio e amor incondicionais”.

AGRADECIMENTOS

À Deus, acima de tudo, pelo dom da vida e por ser minha força e determinação.
Aos meus pais e meu irmão que sempre me apoiaram em minhas decisões. Obrigada,
sem vocês nada disso teria sido possível.

Aos meus amigos do Ministério Universidades Renovadas, por me ensinarem a
conciliar a fé e a razão e mostrarem a verdadeira felicidade.

Ao meu orientador Prof. Dr. Najeh Maissar Khalil e à Prof^a. Dr^a. Rubiana Mara
Mainardes pela oportunidade de fazer parte do grupo de pesquisa, pela confiança e
conhecimentos fornecidos que certamente contribuíram para minha formação profissional e
pessoal.

Ao Prof. Dr. Marco Aurélio Romano por disponibilizar gentilmente a utilização do
Laboratório de Fisiologia e Toxicologia Reprodutiva - UNICENTRO.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Policiano Almeida por permitir a utilização do
Laboratório de Pesquisa em Ciências Interfaciais - UNICENTRO, e ao Matheus Felipe Viante
que auxiliou nas análises.

À Prof^a. Dr^a. Erysa Castro por auxiliar nas análises de difração de raios-X.

Ao Prof. Dr. Ricardo Yoshimitsu Miyahara por permitir a utilização do equipamento
de calorimetria exploratória diferencial, e ao seu aluno Paulo Henrique Gonsalves pelas
análises das amostras.

Ao Programa e ao corpo docente da Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela
oportunidade.

Às minhas amigas, Diani, Daniele, Luciana, Thaysa, Leiziani, Loriangela e Fernanda
por me mostrarem o verdadeiro significado da amizade. Minha graduação e mestrado foram
mais divertidos pela presença de vocês.

À Luciana C., Clescila, Juliana, Débora, Ísis e aos outros colegas do Laboratório de
Nanotecnologia pelo auxílio em experimentos, ensinamentos compartilhados e pela boa
convivência no laboratório.

À Dayane, Sâmela, Marcelly e Camila pela amizade, que mesmo distante ainda fazem
parte da minha vida.

Aos que não me referi, mas que de alguma forma participaram e me auxiliaram neste
período.

À CAPES pelo auxílio financeiro neste estudo.

RESUMO

O ácido gálico (AG) apresenta muitas atividades biológicas, tais como potencial antioxidante e neuroprotetor, porém as suas características físico-químicas limitam o seu uso. Diante disso, o presente trabalho consistiu na obtenção, caracterização físico-química e biológica de nanopartículas poliméricas contendo AG com o objetivo de produzir formulações que possam ser direcionadas ao Sistema Nervoso Central. O AG foi encapsulado em nanopartículas de poli(D,L-ácido-lático-co-glicólico) (PLGA) e nanopartículas de PLGA revestidas com polissorbato 80 (PS80), por meio da técnica de emulsificação-evaporação do solvente com emulsão simples. Um método analítico foi desenvolvido e validado utilizando a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com a finalidade de permitir uma confiável quantificação de AG. A fase móvel do método consistiu de acetonitrila: água: ácido acético 0,4% (50:30:20, v/v/v), em um fluxo de 0,9 mL/min com detecção em 271 nm. Este método apresentou especificidade, linearidade, intervalo, precisão, limite de detecção e quantificação, exatidão e robustez, satisfatórios conforme as resoluções vigentes. As nanopartículas foram caracterizadas quanto à eficiência de encapsulação, diâmetro médio, distribuição de tamanho, potencial de superfície, identificação de grupos funcionais, cristalinidade dos compostos, estabilidade térmica, forma e perfil de liberação. As nanopartículas sem revestimento e revestidas demonstraram características físico-químicas adequadas, com tamanho médio de $223,27 \pm 11,80$ nm e $228,41 \pm 11,16$ nm, respectivamente. Após o armazenamento por 12 semanas, as formulações não apresentaram tendência à floculação ou agregação, entretanto, as nanopartículas com revestimento tiveram seu potencial zeta alterado quando armazenadas mais que 8 semanas em temperatura ambiente. Dessa forma, o recomendado é seu armazenamento em temperatura de -20°C . Os sistemas desenvolvidos apresentaram ausência de toxicidade sobre hemácias nas concentrações de 40 e 20 $\mu\text{g/mL}$ de AG e potencial antioxidante com liberação controlada e dependente da concentração.

Palavras-chave: nanopartículas, ácido gálico, polissorbato 80, antioxidante.

ABSTRACT

Gallic acid (GA), presents several biological activities such as antioxidant and neuroprotective potential, but their physicochemical characteristics limit its use. Considering this, the present study consisted in obtainment, physicochemical and biological characterization of polymeric nanoparticles containing GA with objective to produce formulations can be toward to Central Nervous System. GA was encapsulated into nanoparticles of poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) and PLGA nanoparticles coated with polysorbate 80 (PS80), by emulsification-solvent method with single emulsion. An analytical method was developed and validated by high performance liquid chromatography in order to allow for reliable GA quantification. The mobile phase of the method consisted of acetonitrile: water: 0.4% acetic acid (50:30:20, v/v/v), in a flow 0.9 mL/min with detection at 271 nm. This method presented a suitable specificity, linearity, interval, precision, detection and quantification limits, accuracy and robustness according to current guidelines. Nanoparticles were characterized in relation to encapsulation efficiency, mean diameter, size distribution, surface potential, identification of functional groups, crystallinity thermal stability, shape and release profile. Nanoparticles without coating and coated demonstrated appropriate physicochemical characteristics with mean size of 223.27 ± 11.80 nm and 228.41 ± 11.16 nm, respectively. After storage for 12 weeks, formulations showed no tendency to flocculation and aggregation, however coated nanoparticles presented zeta potential modified when stored over 8 weeks at room temperature. Thus, is the recommend storage at -20°C temperature. The developed systems present lack of toxicity on red blood cells in concentrations of 40 and 20 $\mu\text{g/mL}$ of GA and antioxidant potential with controlled release and concentration dependent.

Keywords: nanoparticles, gallic acid, polysorbate 80, antioxidant.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática da BHE.....	18
Figura 2 - Representação esquemática da estrutura química do polímero PLGA, onde (m) representa o número de unidades do ácido lático e (n) o número de unidades do ácido glicólico.....	24
Figura 3 - Tipos de nanopartículas poliméricas obtidas por vários métodos.....	26
Figura 4 - Representação esquemática do método de emulsificação- evaporação do solvente.....	27
Figura 5 - Estrutura química do AG.....	28
Figura 6 - Cromatograma representativo (absorbância em função do tempo da solução padrão de AG 40 µg/mL. Fase móvel acetonitrila: água: ácido acético 0,4% (50:30:20, v/v), em 271 nm.....	45
Figura 7 - Curva analítica do AG em acetonitrila: água (60:40, v/v). Fase móvel: acetonitrila: água: ácido acético 0,4%, (50:30:20, v/v/v), em 271 nm (n=3).....	46
Figura 8 - Cromatograma representativo (absorbância em função do tempo da solução aquosa de PVA 0,5% (A) e de uma solução padrão de AG 30 µg/mL (B). Fase móvel acetonitrila: água: ácido acético 0,4% (50:30:20, v/v), em 271 nm.....	48
Figura 9 - Curva analítica do AG em acetonitrila: água (60:40, v/v). Fase móvel: acetonitrila: água: ácido acético 0,4%, (50:30:20, v/v/v), em 271 nm (n=3).....	49
Figura 10 - Perfil de distribuição de um dos lotes de nanopartículas de PLGA/PS80 contendo AG.....	56
Figura 11 - Difratogramas do AG, nanopartículas vazias e nanopartículas contendo AG.	58
Figura 12 - FT-IR do AG e da mistura física do polímero com o fármaco.....	59
Figura 13 - FT-IR das nanopartículas de PLGA e PLGA contendo AG.....	60
Figura 14 - FT-IR das nanopartículas de PLGA/PS80 e PLGA/PS80 contendo AG.....	61
Figura 15 - Curvas de aquecimento obtidas por DSC e DTG para o AG.....	62
Figura 16 - Curvas de aquecimento obtidas por DSC e DTG para as nanopartículas de PLGA (A) e nanopartículas de PLGA contendo AG (B).....	63
Figura 17 - Curvas de aquecimento obtidas por DSC e DTG para as nanopartículas de PLGA/PS80 (A) e nanopartículas de PLGA/PS80 contendo AG (B).....	64
Figura 18 - Aspectos morfológicos das nanopartículas de PLGA contendo AG (A) e das nanopartículas de PLGA contendo AG com medição na escala nanométrica (B). Aumento de 41,2 kx.....	65

Figura 19 - Aspectos morfológicos das nanopartículas de PLGA/PS80 contendo AG (A) e das nanopartículas de PLGA/PS80 contendo AG com medição na escala nanométrica (B). Aumento de 47,3 kx.	65
Figura 20 - Perfil de liberação das nanopartículas de AG.	66
Figura 21 - Tamanho das nanopartículas de PLGA contendo AG (A) e nanopartículas de PLGA/PS80 contendo AG (B) (n=3).	69
Figura 22 - Índice de polidispersão das nanopartículas de PLGA contendo AG (A) e nanopartículas de PLGA/PS80 contendo AG (B) (n=3).	69
Figura 23 - Potencial zeta das nanopartículas de PLGA contendo AG (A) e nanopartículas de PLGA/PS80 contendo AG (B), (n=3).	70
Figura 24 - Poços de uma microplaca de Elisa utilizada para a leitura dos sobrenadantes resultantes da centrifugação da suspensão de hemácias.	71
Figura 25 - Porcentagem de hemólise das nanopartículas de PLGA/PS80, AG e nanopartículas de PLGA/PS80 contendo AG.	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Equações matemáticas para os modelos utilizados para descrever as características de liberação de nanopartículas de AG.....	41
Tabela 2 - Condições cromatográficas padronizadas para a quantificação de AG.....	45
Tabela 3 - Precisão intra-corrída e inter-corrída.	47
Tabela 4 - Resultados da exatidão para os padrões de AG.....	47
Tabela 5 - Porcentagem de recuperação e DPR obtido nas análises de robustez após modificações no método original (n=3).	50
Tabela 6 - Parâmetros para a formulação final das nanopartículas de AG.	53
Tabela 7 - Eficiência de encapsulação e quantidade de AG encapsulado às nanopartículas (n=10).....	53
Tabela 8 - Médias do tamanho, índice de polidispersão e distribuição das nanopartículas de AG (n=10).	55
Tabela 9 - Potencial zeta das formulações de nanopartículas.	57
Tabela 10 - Análise cinética da liberação de AG a partir de nanopartículas de PLGA.	67
Tabela 11 - Análise cinética da liberação de AG a partir de nanopartículas de PLGA/PS80.	67
Tabela 12 - Cálculo das constantes matemáticas pelo modelo de Korsmeyer-Peppas.	68
Tabela 13 - Porcentagem de inibição do radical ABTS•+ das nanopartículas de PLGA e PLGA/PS80 contendo AG nas concentrações de 15,62; 7,81 e 3,90 µg/mL nos tempos de 0, 2, 4, 8, 24 e 48 h.	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ΔH	Variação de Entalpia
ABTS	(2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolinona-6-ácido sulfônico))
AG	Ácido gálico
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ApoE	Apolipoproteína E
ATP	Trifosfato de adenosina
BHE	Barreira hematoencefálica
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DLS	<i>Dynamic light scattering</i>
DP	Desvio padrão
DPPH	(2,2 difenil-1-picril-hidrazil)
DPR	Desvio padrão relativo
DR-X	Difração de raios-X
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
DTG	Curva termogravimétrica derivada
ERE's	Espécies reativas de enxofre
ERN's	Espécies reativas de nitrogênio
ERO's	Espécies reativas de oxigênio
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FT-IR	Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier
HPMA	N-(2-hidroxipropil) metacrilamida
ICH	<i>International Conference on Harmonization</i>
LD	Limite de detecção
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade
LQ	Limite de quantificação
MEV-FEG	Microscopia eletrônica de varredura com fonte emissão por efeito de campo
O/A	Óleo em água
(O/A)A	(Óleo em água) em água
PAA	Poli(aspartato)
PB	Tampão fosfato

PBCA	Poli(n-butil-cianoacrilato)
PBS	Tampão fosfato de sódio
PCL	Poli(ϵ -caprolactona)
PDA	Detector de arranjo de fotodiodo
PEG	Poli(etilenoglicol)
PGA	Poli(ácido-glicólico)
PLA	Poli(ácido-lático)
PLGA	Poli(D,L-ácido-lático-co-glicólico)
PLGA/PS80	PLGA com revestimento de PS80
PS80	Polissorbato 80
PVA	Poli(álcool vinílico)
SNC	Sistema Nervoso Central
TG	Termogravimetria

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 Transporte de Fármacos através da Barreira Hematoencefálica	17
2.2 Nanotecnologia.....	21
2.3 Nanopartículas Poliméricas.....	22
2.4 Ácido Gálico	28
3 OBJETIVOS	31
3.1 Objetivos Gerais	31
3.2 Objetivos Específicos	31
4 MATERIAIS	32
4.1 Substâncias e Reagentes	32
4.2 Equipamentos e Acessórios	32
5 METODOLOGIA	34
5.1 Desenvolvimento e Validação de Metodologia Analítica por CLAE	34
5.1.1 Condições Cromatográficas.....	34
5.1.2 Parâmetros de Validação da Metodologia Analítica	34
5.2 Obtenção de Nanopartículas de PLGA e PLGA/PS80 contendo AG	37
5.3 Caracterização Físico-Química das Nanopartículas	38
5.3.1 Determinação da Eficiência de Encapsulação do Fármaco	38
5.3.2 Análise do Diâmetro Médio, Distribuição de Tamanho e Índice de Polidispersão.....	38
5.3.3 Determinação do Potencial Zeta	39
5.3.4 Difração de Raios-X.....	39
5.3.5 Espectroscopia na Região do Infravermelho	39
5.3.6. Calorimetria Exploratória Diferencial e Termogravimetria	39
5.3.7 Análise Morfológica.....	40
5.3.8 Estudo de Liberação <i>in vitro</i>	40
5.4 Estudo de Estabilidade das Nanopartículas frente ao Armazenamento.....	41
5.5 Caracterização Biológica das Nanopartículas	41
5.5.1 Avaliação da Toxicidade Celular sobre Hemácias - Ensaio <i>ex vivo</i>	41
5.5.2 Determinação da Atividade Antioxidante <i>in vitro</i>	42

5.6 Análise Estatística	43
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
6.1 Desenvolvimento e Validação de Metodologia Analítica por CLAE	44
6.1.1 Condições Cromatográficas.....	44
6.1.2 Parâmetros de Validação da Metodologia Analítica	45
6.2 Obtenção de Nanopartículas de PLGA e PLGA/PS80 contendo AG	51
6.3 Caracterização Físico-Química das Nanopartículas	53
6.3.1 Determinação da Eficiência de Encapsulação do Fármaco	53
6.3.2 Análise do Diâmetro Médio, Distribuição de Tamanho e Índice de Polidispersão.....	54
6.3.3 Determinação do Potencial Zeta	56
6.3.4 Difração de Raios-X.....	57
6.3.5 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho	59
6.3.6 Calorimetria Exploratória Diferencial e Termogravimetria	61
6.3.7 Análise Morfológica.....	64
6.3.8 Estudo de Liberação <i>in vitro</i>	66
6.4 Estudo de Estabilidade das Nanopartículas frente ao Armazenamento.....	68
6.5 Caracterização Biológica das Nanopartículas	71
6.5.1 Avaliação da Toxicidade Celular sobre Hemácias - Ensaio <i>ex vivo</i>	71
6.5.2 Determinação da Atividade Antioxidante <i>in vitro</i>	73
7 CONCLUSÕES.....	77
8 REFERÊNCIAS.....	78

1 INTRODUÇÃO

As desordens que afetam o Sistema Nervoso Central (SNC) atingem grande porcentagem da população mundial. Doenças neurodegenerativas como o Alzheimer, Parkinson, esclerose lateral amiotrófica e esclerose múltipla são as principais condições debilitantes do século XXI. Sua causa está ligada ao avanço da idade, às condições ambientais e/ou doenças imunes (KABANOV & GENDELMAN, 2007; NUNES, AL-JAMAL & KOSTARELOS, 2012).

Mesmo com o impacto significativo dessas desordens na sociedade, os avanços no desenvolvimento de novos fármacos ainda são limitados, por exemplo, o tratamento da depressão e esquizofrenia ainda é amplamente baseado em substâncias identificadas por volta de 1950 (AJETUNMOBI *et al.*, 2014). Portanto, as tentativas de encontrar meios efetivos para o tratamento de doenças que afetam o SNC são relevantes. A eficácia terapêutica é limitada principalmente devido à presença da barreira hematoencefálica (BHE) que possui alta seletividade para a entrada de fármacos no cérebro (KABANOV & GENDELMAN, 2007; NUNES, AL-JAMAL & KOSTARELOS, 2012).

O recente e rápido avanço no campo da nanotecnologia apresenta uma oportunidade para enfrentar esses desafios. A nanotecnologia utiliza materiais com uma menor organização funcional, capazes de interagir com sistemas biológicos à nível molecular. Assim, oferece formas de manipular sistemas biológicos complexos com maiores seletividade e precisão que as abordagens farmacológicas convencionais (MODI *et al.*, 2009; AJETUNMOBI *et al.*, 2014).

O ácido gálico (AG) é um importante composto polifenólico presente em plantas. Diversas atividades biológicas têm sido atribuídas a este composto, tais como antiviral, antifúngica, antitumoral, além da sua potente atividade antioxidante (NABAVI *et al.*, 2012). O AG apresenta a habilidade de remover as ERO's, tais como os ânions superóxido, peróxido de hidrogênio, radicais hidroxil e ácido hipocloroso. Devido a isto, muitos estudos têm relatado seu efeito neuroprotetor, tais como efeito benéfico na neurotoxicidade mediada pela proteína beta-amiloide e no estresse oxidativo cerebral induzido por estreptozocina (MANSOURI *et al.*, 2013a).

A dose letal mediana para o AG em ratos é de 5 g/kg (DHINGRA, CHHILLAR & GUPTA, 2012; MANSOURI *et al.*, 2013b). No estudo de Niho *et al.* (2001) não foram observados efeitos adversos em ratos nas concentrações de 119 e 128 mg/kg/dia para machos e fêmeas, respectivamente, por um período de 13 semanas. Em concentrações maiores ocorreu

o aparecimento de anemia e hipertrofia das células do fígado. O AG é rapidamente oxidado de modo não enzimático em soluções fisiológicas, gerando ânions superóxido, peróxido de hidrogênio e quinonas. Em consequência disso, estes compostos podem produzir diferentes efeitos vasculares que podem causar dano celular, sugerindo a possibilidade de efeitos adversos *in vivo* a longo-prazo em condições apropriadas (GIL-LONGO & GONZÁLEZ-VÁZQUEZ, 2010).

Além disso, Hwang *et al.* (2008) afirma que a biodisponibilidade oral do AG, é muito baixa, sendo que a concentração plasmática provável alcançada seja dez vezes menor daquela necessária para produzir algum efeito. Em humanos, a sua concentração plasmática encontrada, após a administração oral de 50 mg, foi na faixa de 1,8-2,1 μM após aproximadamente 1,5 h, sendo que é indetectável 12 h de sua administração (SHAHRZAD *et al.*, 2001). Concluindo-se que o AG possui um curto tempo de meia-vida de eliminação.

Devido a tais características, seu uso é limitado. Portanto, para alcançar uma resposta terapêutica desejável é necessário melhorar a biodisponibilidade do AG. Entre as diferentes estratégias, as nanopartículas representam uma interessante alternativa, pois além de protegerem o fármaco encapsulado de condições externas, elas também podem favorecer sua absorção pelas membranas biológicas. Além de que os efeitos adversos podem ser diminuídos por meio do direcionamento a órgãos específicos e alvos celulares (DELIE & BLANCO-PRÍETO, 2005; HUGHES, 2005; ZHANG *et al.*, 2013).

Assim, o presente estudo realizou o desenvolvimento tecnológico, a caracterização físico-química de nanopartículas poliméricas contendo AG e verificação das atividades biológicas *in vitro* do fármaco encapsulado, com o objetivo de produzir formulações que possam ser direcionadas ao SNC.

2 REVISÃO DA LITERATURA

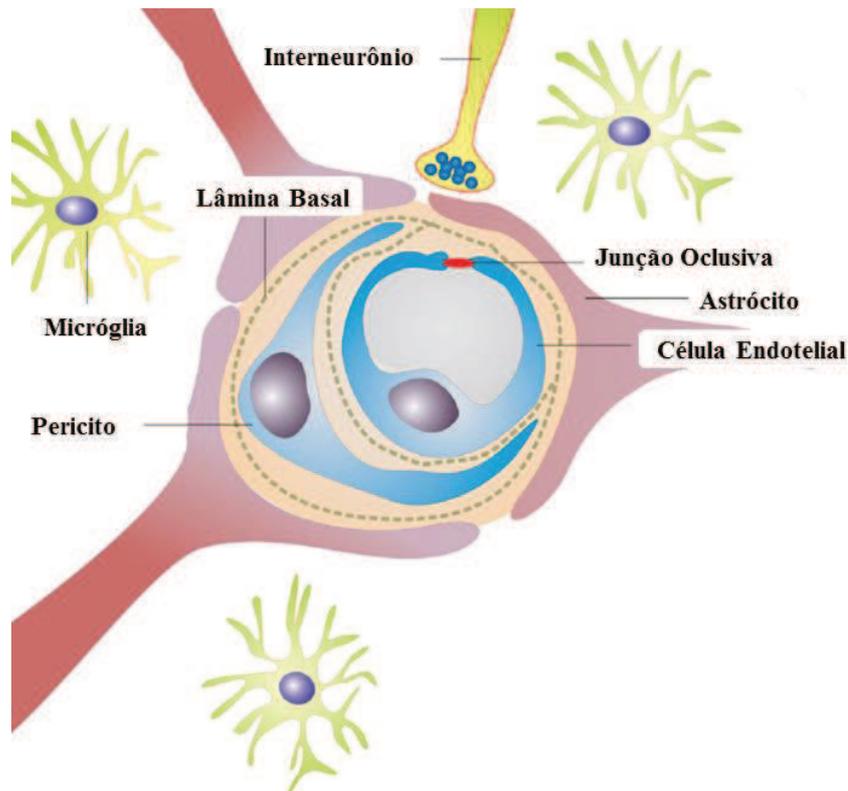
2.1 Transporte de Fármacos através da Barreira Hematoencefálica

O cérebro possui barreiras que dificultam o acesso de agentes terapêuticos e de diagnóstico para o SNC. Entender as características fisiológicas dessas barreiras se torna necessário para que fármacos sejam direcionados ao cérebro e desempenhem uma atividade efetiva (KABANOV & GENDELMAN, 2007). A BHE, originalmente descrita por Paul Ehrlich em 1885, atua internamente como uma barreira que protege o cérebro contra substâncias nocivas e patógenos presentes na circulação sanguínea como vírus, bactérias, parasitas e toxinas. Além de auxiliar na irrigação dos nutrientes necessários para o bom funcionamento do cérebro (ALAM *et al.*, 2010; KANWAR *et al.*, 2012; WONG, WU & BENDAYAN, 2012).

A BHE é responsável por diversas funções cerebrais como a manutenção da homeostasia tecidual, regulação do tônus vascular, fibrinólise, coagulação, ativação e migração de células sanguíneas durante processos patológicos e vascularização de tecidos neoplásicos (ALAM *et al.*, 2010). Existem aproximadamente 100 bilhões de capilares no cérebro humano que formam uma rede com área superficial de aproximadamente 20 m². Apesar dessa enorme área superficial, a BHE carece de fendas intercelulares e fenestrações, e apresenta altos níveis de enzimas metabolizadoras o que restringe significativamente a entrada de solutos da periferia para o SNC (KABANOV & GENDELMAN, 2007; KANWAR *et al.*, 2012).

A microvasculatura cerebral (Figura 1) é formada por células endoteliais, pericitos, astrócitos, micróglia, neurônios e matriz extracelular. As células endoteliais formam as paredes dos capilares, possuem capacidade endocítica e compartilham a membrana basal com os pericitos. Anatomicamente, estas células são diferentes das células endoteliais periféricas, pois não existem fenestrações e possuem um número superior de mitocôndrias, resultando em uma atividade metabólica mais intensa. São unidas pelas junções oclusivas (*tight junctions*) que formam uma barreira celular quase impermeável que limita e regula o fluxo de células de defesa do sistema imune (macrófagos), xenobióticos e compostos endógenos, além de causar uma redução de 100 vezes da pinocitose através do endotélio. A presença de tais junções entre as células endoteliais resulta em uma alta resistência elétrica quando comparada a de outros tecidos corporais (FARAJI & WIPF, 2009; ALAM *et al.*, 2010; NUNES, AL-JAMAL & KOSTARELOS, 2012; WONG, WU & BENDAYAN, 2012; BICKER *et al.*, 2014).

Figura 1 - Representação esquemática da BHE.



(Adaptado de Kabanov & Gendelman, 2007).

O outro lado dessa membrana é quase totalmente cercado pelos astrócitos que formam uma rede ao longo dos vasos sanguíneos. Desempenham um papel essencial no SNC, atuam fornecendo suporte bioquímico às células endoteliais, regulam o fluxo sanguíneo, fornecem nutrientes aos tecidos nervosos, mantêm o equilíbrio de íons extracelulares e auxiliam no processo de reparação e cicatrização do cérebro e da medula espinhal após lesões traumáticas. Os pericitos são importantes para maturação, remodelagem e manutenção do sistema vascular por meio da secreção dos fatores de crescimento ou modulação da matriz extracelular. Eles também estão envolvidos no transporte através da BHE e na regulação da permeabilidade vascular, além de possuir alta capacidade fagocítica. As terminações nervosas se localizam próximas às células endoteliais (ALAM *et al.*, 2010; NUNES, AL-JAMAL & KOSTARELOS, 2012).

A BHE é facilmente permeável para moléculas lipofílicas com peso molecular inferior a 400 Da. Grandes moléculas, tais como proteínas recombinantes, anticorpos monoclonais, peptídeos e ácidos nucleicos, não são capazes de permear o parênquima cerebral. Desta forma, existem mecanismos especializados de transporte para os nutrientes essenciais. A absorção de moléculas ocorre por meio de dois mecanismos, transporte ativo e passivo. A

difusão é o processo passivo mais simples de transporte dependente do gradiente de concentração e pode ocorrer através da membrana (transcelular) ou entre as células (transporte paracelular), sendo dependente do tamanho e lipofilicidade dos solutos (KANWAR *et al.*, 2012; NUNES, AL-JAMAL & KOSTARELOS, 2012; WONG, WU & BENDAYAN, 2012). A difusão paracelular ocorre em uma extensão limitada da BHE devido às junções oclusivas, visto que a maioria dos fármacos com moléculas menores têm alto peso molecular ou são hidrossolúveis o que impede sua difusão simples (ALAM *et al.*, 2010; WONG, WU & BENDAYAN, 2012).

O transporte mediado por carreadores envolve proteínas que facilitam o movimento de solutos pouco permeáveis nas membranas. A difusão facilitada é uma forma de endocitose que envolve a passagem mediada por carreadores de solutos através de membranas celulares dependente do gradiente de concentração (WONG, WU & BENDAYAN, 2012). Os solutos se ligam às proteínas carreadoras específicas que desencadeiam uma mudança conformacional na proteína, resultando no transporte para o outro lado da membrana. Este mecanismo contribui para o transporte de várias substâncias incluindo aminoácidos, nucleosídeos e pequenos peptídeos. A endocitose inclui a fagocitose, pinocitose e endocitose mediada por receptores (ALAM *et al.*, 2010; BIDDLESTONE-THORPE *et al.*, 2012).

O transporte ativo é um processo mediado por proteínas carreadoras, mas que utiliza a hidrólise de trifosfato de adenosina (ATP) como fonte de energia para mover moléculas contra um gradiente de concentração (BIDDLESTONE-THORPE *et al.*, 2012; WONG, WU & BENDAYAN, 2012). Os mecanismos de efluxo também estão presentes na BHE. O mais conhecido é a glicoproteína P que tem uma alta propensão de bombear para fora os compostos indesejáveis, tais como fármacos antitumorais e antibióticos, resultando em uma acumulação restrita de tais moléculas dentro do cérebro (NUNES, AL-JAMAL & KOSTARELOS, 2012).

Em doenças onde a integridade da BHE é comprometida, ocorre a alteração da permeabilidade e o recrutamento de citocinas ao cérebro, permitindo a entrada de vários agentes terapêuticos ou de diagnóstico neste local (KANWAR *et al.*, 2012). Esta permeabilidade aumentada tem sido verificada em casos de acidente vascular cerebral, em doenças inflamatórias e infecciosas, esclerose múltipla, doença de Alzheimer, encefalopatia séptica, demência induzida pelo vírus HIV e câncer (KOO, RUBINSTEIN & ONYUKSEL, 2005).

Entretanto, os estágios iniciais dessas desordens ocorrem enquanto a BHE está intacta. Por isso, é importante desenvolver formas de atravessá-la, não somente para a liberação de fármacos, mas também para o diagnóstico e prevenção. A administração terapêutica pode ser

alcançada, contornando esta barreira com técnicas invasivas, como a injeção intracraniana direta ou a administração intraventricular, mas estes métodos estão longe de serem ideais, dado o risco de infecção e a despesa cirúrgica elevada. Como resultado, as técnicas não invasivas estão atraindo mais atenção como métodos alternativos de atravessar a BHE (KANWAR *et al.*, 2012).

Neste contexto, as nanopartículas têm sido amplamente investigadas como sistemas carreadores capazes de aumentar a penetração ou superação da BHE. Os parâmetros farmacocinéticos dessas nanopartículas podem ser alterados para assegurar uma liberação direcionada dos fármacos encapsulados, visto que sua persistência na circulação sistêmica é necessária (HUGHES, 2005; MODI *et al.*, 2009; KANWAR *et al.*, 2012). As formulações convencionais apresentam a superfície hidrofóbica e são rapidamente opsonizadas e massivamente eliminadas pelos macrófagos do sistema fagocítico mononuclear (KUMARI, YADAV & YADAV, 2010).

Um método amplamente utilizado para retardar essa opsonização é adicionar um revestimento que possa impedir as interações eletrostáticas e hidrofóbicas que estão envolvidas na ligação das opsoninas à superfície das nanopartículas. Portanto, a funcionalização da superfície pode determinar o comportamento de nanopartículas *in vitro* e *in vivo*, desempenhando um importante papel na sua capacidade de alcançarem o cérebro (CHENG *et al.*, 2014; KREUTER, 2014). As moléculas utilizadas para esse fim podem ser surfactantes não iônicos, como os polissorbatos, sendo o polissorbato 80 o de maior utilização (PS80) (OWENS III & PEPPAS, 2006).

A endocitose é o mecanismo, comprovado experimentalmente, pelo qual as nanopartículas revestidas com PS80 chegam até o cérebro. É possível que os polissorbatos fixem na superfície de nanopartículas a apolipoproteína E (apoE) que desempenha um importante papel no transporte das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) para dentro do cérebro. Depois que a apoE está ligada à superfície, as nanopartículas similares às partículas de LDL interagem com seus receptores presentes nas células endoteliais dos capilares do cérebro promovendo a internalização das nanopartículas (SUN *et al.*, 2004; WOHLFART, GELPERINA & KREUTER, 2012).

As nanopartículas revestidas com PS80 são amplamente estudadas para o direcionamento cerebral de fármacos até o SNC. Wang *et al.* (2009) desenvolveram nanopartículas de poli(n-butil-cianoacrilato) (PBCA) revestidas com PS80 contendo gencitabina, sendo obtidos resultados favoráveis *in vitro* e *in vivo*. As nanopartículas inibiram a proliferação de células de glioblastoma *in vitro* e o crescimento do tumor em modelo animal

com ratos. Wilson *et al.* (2008) encapsularam rivastigmina em nanopartículas de PBCA revestidas com PS80 que desempenharam um papel importante no direcionamento cerebral do fármaco em comparação com o fármaco livre, podendo significar uma melhora no tratamento da doença de Alzheimer. Jose *et al.* (2014) obtiveram nanopartículas de PLGA revestidas com PS80 contendo bacoside A, onde foram atingidas altas concentrações cerebrais do fármaco confirmando o potencial do PS80 como revestimento de superfície para o tratamento de doenças do SNC.

2.2 Nanotecnologia

Em 1959, o físico Richard P. Feynman mencionou pela primeira vez a possibilidade de manipular e controlar a matéria em escala de átomos e moléculas, imaginando toda a Enciclopédia Britânica escrita na cabeça de um alfinete (FEYNMAN, 1960; SAHOO, PARVEEN & PANDA, 2007; EZHILARASI *et al.*, 2013). Em 1974, Nario Taniguchi definiu o termo nanotecnologia como a capacidade de examinar e controlar a matéria em escala nanométrica que corresponde a uma magnitude de 10^{-9} m (EZHILARASI *et al.*, 2013).

Desde então, a nanotecnologia é utilizada em uma extensa gama de aplicações nos diferentes campos da física, química e biologia (SANCHEZ & SOBOLEV, 2010; CUPAIOLI *et al.*, 2014). Os usos promissores dessa tecnologia têm emergido em alguns setores fundamentais, tais como energia, comunicação, purificação da água, redução da poluição e progresso ambiental, melhoramento de materiais e novos produtos, agricultura, eletrônicos, ciência forense, espaço e aplicações médicas e biomédicas, criando um mercado de bilhões de dólares (KUMARI, YADAV & YADAV, 2010; FERREIRA, CEMLYN-JONES & CORDEIRO, 2013).

A nanotecnologia utiliza as nanopartículas como carreadores coloidais com tamanho na faixa de 10 a 1000 nm, em geral próximo a 200 nm (WANG & ZHANG, 2012; KREUTER, 2014). Tais carreadores são muito versáteis e variáveis quanto ao seu arranjo estrutural, tornando possível sua utilização no diagnóstico clínico de doenças e na liberação controlada de fármacos (BANYAL *et al.*, 2013).

As nanopartículas são frequentemente utilizadas para melhorar o valor terapêutico de vários fármacos e moléculas bioativas. A nanoencapsulação de fármacos pode reduzir as despesas hospitalares e os riscos de toxicidade, além de aumentar a adesão do paciente ao tratamento e melhorar parâmetros como eficácia, especificidade, biodisponibilidade,

tolerabilidade, tempo de retenção e índice terapêutico dos correspondentes fármacos (ALEXIS *et al.*, 2008; KUMARI, YADAV & YADAV, 2010).

Essas formulações ocasionam a proteção da degradação prematura e interação com o meio biológico e um aumento da absorção em um tecido específico (KUMARI, YADAV & YADAV, 2010). A regulação da velocidade de liberação e distribuição do fármaco ocasiona o aumento da permeabilidade nas membranas biológicas e uma concentração sustentada dentro da janela terapêutica (HUGHES, 2005; ACHARYA & SAHOO, 2011; MO *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2013). Portanto, as nanopartículas levam a uma alta eficiência terapêutica com uma toxicidade geral mais baixa, o que confirma os seus diversos benefícios (ACHARYA & SAHOO, 2011).

Diversos sistemas nanoestruturados carreadores de fármacos têm sido estudados para o uso terapêutico com grande entusiasmo em ambas as aplicações, acadêmica e industrial (ACHARYA & SAHOO, 2011). Desde que o primeiro sistema de liberação controlada de fármacos foi aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) em 1990, a Anfotericina B Lipossomal, outros estão disponíveis comercialmente para o tratamento de diversas doenças como câncer, infecção fúngica e degeneração muscular. O custo médio e tempo necessário para desenvolver estes sistemas são significativamente menores que para um novo fármaco (ZHANG *et al.*, 2013). O mercado mundial de sistemas nanoestruturados para a liberação controlada é estimado, todo ano, em 60 bilhões de dólares, sendo utilizados por cerca de 100 milhões de pessoas a cada ano (ALEXIS *et al.*, 2008).

Os tipos de carreadores utilizados podem ser polímeros, lipossomas, micelas poliméricas, nanogéis, metais, dendrímeros, dentre outros (ACHARYA & SAHOO, 2011; PARVEEN, MISRA & SAHOO, 2012). A eliminação das nanopartículas é desejável depois da sua administração e desenvolvimento de sua função, dessa forma as nanopartículas biodegradáveis são preferidas que nanopartículas não biodegradáveis (ex.: coloides metais, cerâmicas) (MEI *et al.*, 2013).

2.3 Nanopartículas Poliméricas

A incorporação de um polímero em um sistema na escala nanométrica forma uma camada protetora para o fármaco e auxilia na estabilidade coloidal *in vitro* (para estocagem) e *in vivo* (estabilidade biológica) das nanopartículas (WANG & THANOU, 2010). Os polímeros são biodegradáveis e podem ser facilmente eliminados do organismo por meio da

opsonização e fagocitose após realizar sua tarefa como um carreador de fármacos (SOSNIK *et al.*, 2010; MEI *et al.*, 2013).

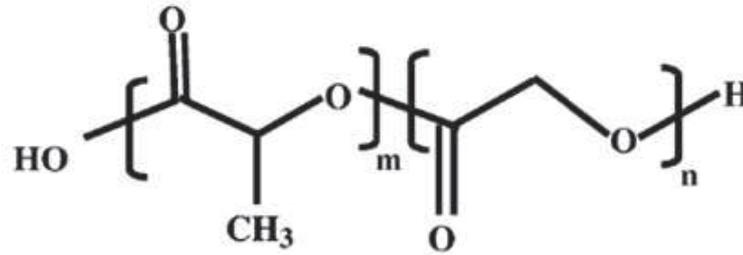
As nanopartículas poliméricas são amplamente utilizadas, pois possuem a capacidade de ser alvo passivo para tumores, alta eficiência de encapsulação e desenvolvimento de uma ampla gama de agentes terapêuticos (HE *et al.*, 2010). Além disso, as nanopartículas poliméricas são estáveis no sangue, não possuem toxicidade, não são trombogênicas, não desencadeiam reações inflamatórias e não ativam os neutrófilos (KUMARI, YADAV & YADAV, 2010). São frequentemente captadas pelas células do sistema imune e por isso são imunocompatíveis (NAAHIDI *et al.*, 2013). Possuem estabilidade estrutural e alta capacidade de ligação à fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos tais como medicamentos, proteínas, peptídeos, e ácidos nucleicos, além de apresentarem viabilidade de administração por diferentes vias (KUMARI, YADAV & YADAV, 2010; BANYAL *et al.*, 2013; SOSNIK *et al.*, 2010).

As propriedades das nanopartículas sintetizadas como o perfil de liberação do fármaco, potencial zeta, dentre outras, podem ser manipuladas por meio da escolha de diferentes polímeros, surfactantes, dimensões do monômero e solventes orgânicos. Tais estruturas contêm grupos funcionais que podem ser transformados de acordo com a molécula do fármaco ou alvos ligantes (BANYAL *et al.*, 2013).

Os polímeros podem ser de origem natural ou de origem sintética. Os polímeros naturais mais utilizados são heparina, quitosana, dextrana, albumina, gelatina, alginato e colágeno, e os polímeros sintéticos são poli(ácido-lático) (PLA), poli(ácido-glicólico) (PGA), poli(D,L-ácido-lático-co-glicólico) (PLGA), polietilenoglicol (PEG), poli(ϵ -caprolactona) (PCL), poli(aspartato) (PAA) e N-(2-hidroxipropil) metacrilamida (HPMA) (EGUSQUIAGUIRRE *et al.*, 2012; MEI *et al.*, 2013).

A taxa de degradação dos polímeros e subsequente liberação do fármaco podem ser controladas pela modificação da cadeia lateral do polímero, desenvolvimento de novos polímeros, ou síntese de copolímeros. O PLGA (Figura 2) é um copolímero do PLA e PGA e um dos materiais mais comuns utilizados como carreador devido a sua ótima biocompatibilidade e biodegradabilidade (ALEXIS *et al.*, 2008; KUMARI, YADAV & YADAV, 2010). Sua aprovação para uso humano e em nanomedicamentos foi concedida pelo FDA (KUMARI, YADAV & YADAV, 2010).

Figura 2 - Representação esquemática da estrutura química do polímero PLGA, onde (m) representa o número de unidades do ácido láctico e (n) o número de unidades do ácido glicólico.



(Adaptado de Acharya & Sahoo, 2011).

O PGA é mais hidrofílico quando comparado ao PLA, pois não possui um grupo metilo e é mais susceptível a hidrólise, fazendo deste polímero facilmente degradável. Alternativamente, o PLA é relativamente mais estável no corpo (ALEXIS *et al.*, 2008). A biodegradação do PLGA produz ácido láctico e ácido glicólico, estes são metabolizados no ciclo do ácido carboxílico (ciclo de Krebs) e eliminados do organismo na forma de água e dióxido de carbono. Desde que o corpo efetivamente lida com esses dois monômeros, existe uma segurança sistêmica associada à utilização do PLGA para a liberação de fármacos (KUMARI, YADAV & YADAV, 2010; MITTAL *et al.*, 2011).

As nanopartículas de PLGA não somente prolongam o tempo de circulação *in vivo* de fármacos de alguns minutos para muitas horas, mas também reduz a captação celular ao longo da via endocítica (ACHARYA & SAHOO, 2011). As pesquisas envolvem sua utilização para o tratamento do câncer, Parkinson, Alzheimer, doenças infecciosas, propósitos de imunização, diagnóstico, liberação controlada de fármacos e vacinas (WILSON *et al.*, 2008; MO *et al.*, 2012; FERREIRA, CEMLYN-JONES & CORDEIRO, 2013; NAAHIDI *et al.*, 2013). Como exemplos, Fonseca, Simões & Gaspar (2002) desenvolveram um sistema de liberação polimérico para o paclitaxel com o objetivo de melhorar o índice terapêutico do fármaco e evitar seus efeitos adversos. Para isso, nanopartículas de PLGA contendo paclitaxel foram obtidas pelo método de deposição interfacial.

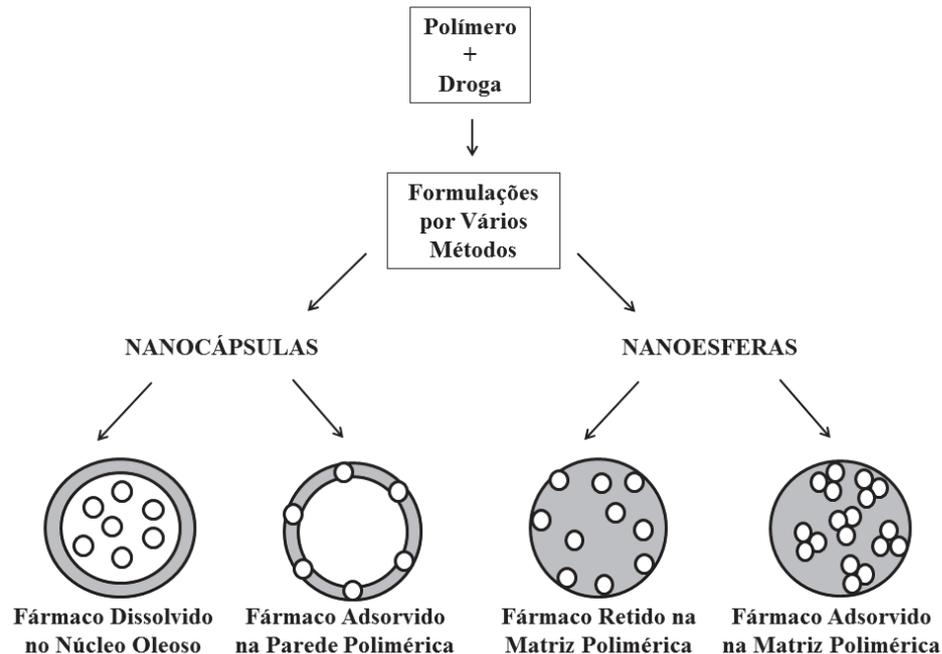
A co-encapsulação de tamoxifeno e topotecano em nanopartículas de PLGA foi obtida com sucesso por Khuroo *et al.* (2014). A formulação final conseguiu diminuir as doses e sua frequência com um efeito sustentado desejável. Sonam & Kumar (2014) otimizaram uma formulação de nanopartículas de PLGA contendo cefixima, a qual demonstrou uma liberação sustentada e penetração através do epitélio intestinal com boa atividade antibacteriana, sendo uma melhor opção para a liberação controlada de antibióticos. Complexos de dendritos e plasmídeos condensados contendo o gene para o antígeno protetor do *Bacillus anthracis*,

foram encapsulados em nanopartículas de PLGA (RIBEIRO *et al.*, 2007). Esse sistema induziu a resposta imune das células T-dependentes. Demonstrando a ampla gama de aplicação das nanopartículas de PLGA, da encapsulação de moléculas simples, co-encapsulação até como adjuvante para novas vacinas.

A natureza ácida de monômeros de PLGA não é adequada para fármacos ou moléculas bioativas. Assim, a adição de surfactantes em formulações de PLGA é uma forma de contornar este problema (KUMARI, YADAV & YADAV, 2010). O tamanho das partículas de PLGA pode ser ajustado pela mudança da sua composição química bem como pelo método de obtenção. Ao passo que a liberação e a resposta eficaz dos fármacos encapsulados são influenciadas pela modificação da superfície do PLGA, método de obtenção, tamanho das partículas, aditivos da formulação, peso molecular do fármaco e proporção de ácido lático e ácido glicólico do PLGA (KUMARI, YADAV & YADAV, 2010; ZHANG *et al.*, 2013).

As nanopartículas poliméricas podem ser classificadas de acordo com seu processo de obtenção (Figura 3). As nanocápsulas são sistemas vesiculares, que atuam como uma espécie de reservatório. São compostas de uma parede polimérica contendo um núcleo líquido (água ou óleo) onde o fármaco é encapsulado. As nanoesferas são compostas de uma matriz polimérica na qual o fármaco pode estar disperso (DELIE & BLANCO-PRÍETO, 2005; SOSNIK *et al.*, 2010; RAO & GECKELER, 2011). Substâncias ativas podem ser encapsuladas dentro de sua matriz, adsorvidas ou conjugadas na sua superfície (YANG *et al.*, 2013). Em geral, elas são esféricas, mas “nanoesferas” com uma forma não esférica são também descritas na literatura (RAO & GECKELER, 2011).

Figura 3 - Tipos de nanopartículas poliméricas obtidas por vários métodos.



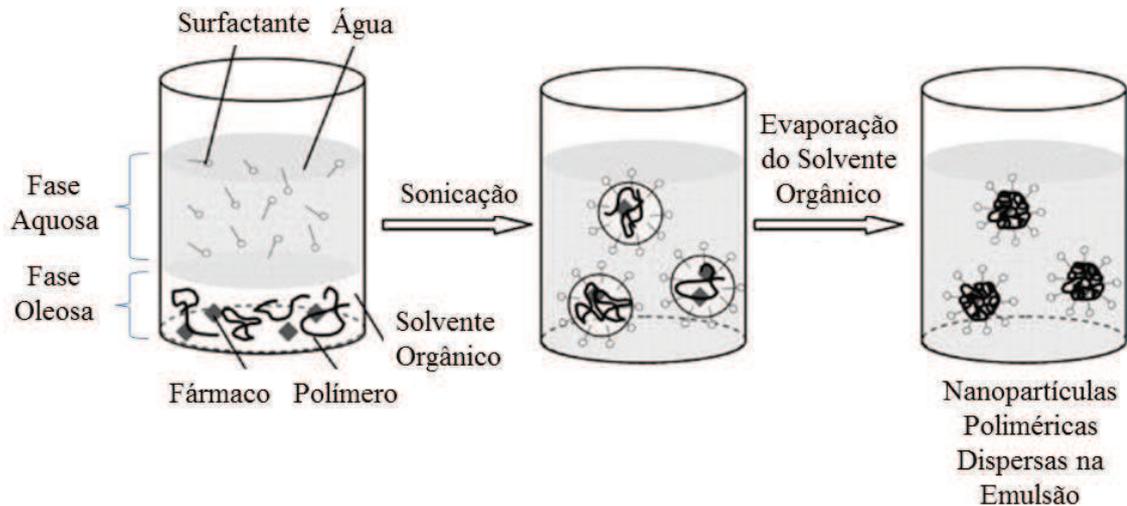
(Adaptado de Schaffazick *et al.*, 2003).

As nanopartículas poliméricas têm sido sintetizadas utilizando vários métodos de acordo com as necessidades da sua aplicação e tipo de fármaco a ser encapsulado (KUMARI, YADAV & YADAV, 2010). Tais métodos podem ser divididos em duas classes gerais. A primeira classe envolve a polimerização de monômeros, e a segunda baseia-se na dispersão de polímeros pré-formados. Exemplos da primeira são a polimerização em emulsão e a polimerização em dispersão. Exemplos da segunda classe são salting-out, nanoprecipitação, emulsificação-difusão do solvente e emulsificação-evaporação do solvente (HUGHES, 2005; KOO, RUBINSTEIN & ONYUKSEL, 2005).

A técnica emulsificação-evaporação do solvente é uma versão modificada do método evaporação do solvente e é o método mais comum utilizado para o preparo de nanopartículas (Figura 4). Primeiramente, o polímero é dissolvido em um solvente volátil (tais como diclorometano, clorofórmio), misturado a uma fase aquosa e a solução resultante é emulsionada por agitação utilizando uma fonte de alta energia como agitação de alto cisalhamento, homogeneizadores de alta velocidade ou alta pressão, ultrasonicador ou microfluidizador. A formação das nanopartículas é alcançada pela evaporação do solvente sob pressão reduzida. Posteriormente, as nanopartículas solidificadas podem ser recolhidas por ultracentrifugação e lavadas com água destilada para remover aditivos, tais como tensoativos. Geralmente, um polímero dissolvido em um solvente orgânico constitui a fase oleosa,

enquanto que a água contendo o emulsionante forma a fase aquosa. O fármaco é disperso na rede da matriz polimérica (RAO & GECKELER, 2011; EZHILARASI *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2013).

Figura 4 - Representação esquemática do método de emulsificação-evaporação do solvente.



(Adaptado de Musyanovych *et al.*, 2008).

Um grande número de parâmetros no processamento das nanopartículas podem ser alterados tais como potência e duração da energia aplicada, volume da fase aquosa, pH da fase aquosa, concentração do polímero e fármaco, peso molecular do polímero, proporção dos polímeros, grupos terminais do polímero, volume de solvente e concentração de surfactante. Cada um desses parâmetros influencia o tamanho e conteúdo de fármaco nas nanopartículas (BUDHIAN, SIEGEL & WINEY, 2007). A coalescência determina o tamanho final da partícula, o qual é maior dependendo da condição da evaporação. Isto é importante para a otimização das condições do processo, pois, ajustando as condições da evaporação do solvente tais como temperatura e pressão, melhora-se a qualidade das nanopartículas produzidas. Além disso, o uso de surfactantes pode minimizar o efeito de coalescência e produzir nanopartículas menores (ZHANG *et al.*, 2013).

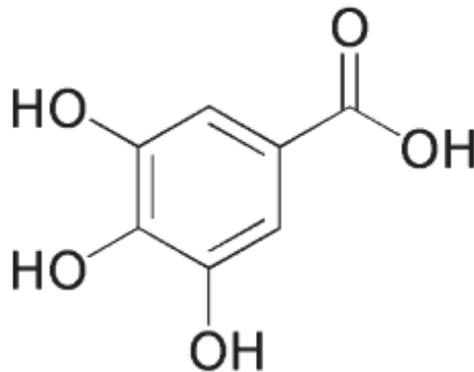
A evaporação-emulsificação do solvente é amplamente usada para encapsular fármacos lipofílicos. Entretanto, o nível de carregamento para fármacos hidrofílicos, tais como proteínas e peptídeos, é geralmente pobre devido a sua difusão para a fase aquosa, antes da solidificação do polímero e seu encapsulamento (ZHANG *et al.*, 2013). Assim, duas estratégias principais estão sendo utilizadas para a formação de emulsões: a preparação de

emulsões simples óleo em água (O/A) para fármacos lipofílicos ou emulsões múltiplas (óleo em água) em água (O/A)/A para fármacos hidrofílicos (RAO & GECKELER, 2011).

2.4 Ácido Gálico

O AG também denominado de ácido 3,4,5 tri-hidroxi-benzóico ($C_6H_2(OH)_3COOH$) (Figura 5), é um composto fenólico simples poli-hidroxiado, sendo distribuído em todo o reino vegetal. Altos teores podem ser encontrados em diversas frutas, nozes, chá verde, vinhos, nas angiospermas e algumas algas verdes (CHANWITHEESUK *et al.*, 2007; HSU *et al.*, 2011; MASOUD *et al.*, 2012). O AG e seus derivados são produtos naturais de hidrólise do ácido tânico (DANESHFAR, HASSAN & HOMAYOUN, 2008).

Figura 5 - Estrutura química do AG.



(Adaptado de Wang, Halquist & Sweet, 2013).

O AG se apresenta na forma de um pó cristalino branco com peso molecular de 179,12 g/mol, ponto de fusão de 250°C e densidade de 1,7 g/cm³. Possui solubilidade aquosa teórica de 10 mg/mL (log P = -0,53 ± 0,05), alta solubilidade em metanol e etanol e menor em acetato de etila (LU *et al.*, 2006; DANESHFAR, HASSAN & HOMAYOUN, 2008; VERMA, SINGH & MISHRA, 2013). O AG é um ácido orgânico com dois valores de pKa, 4,10 para o grupo carboxílico e 8,38 para o grupo hidroxila (MORENO-ÁLVAREZ *et al.*, 2010).

Possui várias aplicações na indústria química, alimentar e farmacêutica, é utilizado como um padrão para a determinação do teor de fenol de vários analitos pelo ensaio de Folin-Ciocalteu, na produção do antibiótico trimetoprim, corantes e tintas. O AG é comumente usado na indústria farmacêutica, porque muitos ensaios *in vivo* e *in vitro* em humanos,

animais e cultura de células têm fornecido evidências para suas várias atividades (MASOUD *et al.*, 2012). Possui uma enorme demanda de cerca de 8000 toneladas por ano em todo o mundo, devido a sua importância (DANESHFAR, HASSAN & HOMAYOUN, 2008; PARDESHI, DHODAPKAR & KUMAR, 2014).

Dentre as atividades biológicas do AG, a antitumoral é muito estudada (CHEN & CHANG, 2012; CIRILLO *et al.*, 2010; HO *et al.*, 2013; REDDY *et al.*, 2012). A citotoxicidade causada por este composto atua somente em células cancerosas não danificando as células saudáveis (DE MEJÍA *et al.*, 2006). Diversas linhagens tumorais humanas já foram testadas demonstrando tal potencial, dentre elas linfoma (CHEN & CHANG, 2012), carcinoma renal e de próstata (CIRILLO *et al.*, 2010), adenocarcinoma gástrico (HO *et al.*, 2013), adenocarcinoma mamário (HWANG *et al.*, 2008), melanoma (LOCATELLI *et al.*, 2009), glioblastoma, adenocarcinoma cervical (YOU & PARK, 2011), leucemia mielóide crônica (REDDY *et al.*, 2012) e leucemia promielocítica aguda (HUANG *et al.*, 2012).

Além disso, outras ações biológicas têm sido demonstradas, tais como anti-inflamatória (YOON *et al.*, 2013; HSIANG *et al.*, 2013), antibacteriana (CHANWITHEESUK *et al.*, 2007), antialérgica (VO, NGO & KIM, 2012), cardioprotetora (PRISCILLA & PRINCE, 2009; UMADEVI *et al.*, 2012), neuroprotetora (BAN *et al.*, 2008; NABAVI *et al.*, 2012; MANSOURI *et al.*, 2013a), hepatoprotetora (TUNG *et al.*, 2009; PUNITHAVATHI *et al.*, 2011a), gastroprotetora (PAL *et al.*, 2010), antiulcerogênica (CHATTERJEE *et al.*, 2012) e anti-hiperglicêmica (PUNITHAVATHI *et al.*, 2011b).

A atividade antioxidante do AG é muito estudada (YEN, DUH & TSAI, 2002; PAL *et al.*, 2010; CHO *et al.*, 2011; HABTEMARIAM, 2011; BHADORIYA, SHARMA & SOLANKI, 2012), estando relacionada as suas outras ações biológicas. É conhecido por proteger as células e tecidos humanos contra o estresse oxidativo, além de ser um forte agente quelante formando complexos altamente estáveis com o Fe (III) (KANBAK *et al.*, 2012). Possui potencial anti-radical, por meio da remoção de radicais livres e inibição da peroxidação lipídica, sendo este composto mais efetivo que a vitamina E na remoção de radicais DPPH (2,2 difenil-1-picril-hidrazil) (ABDELWAHED *et al.*, 2007).

O AG protege as células de danos induzidos pelas radiações UV-B e ionizante. Em concentrações mais elevadas, atua como um pró-oxidante (KLAJNERT & BRYSEWSKA, 2007). O efeito pró-oxidante do AG em células de mamíferos tem induzido a citotoxicidade e a apoptose, ambas mediadas pelas ERO's (HABTEMARIAM, 2011). O AG exerce efeitos antiproliferativos em células cancerosas através da geração de H₂O₂ (KIM *et al.*, 2009).

Vários estudos têm identificado a atividade neuroprotetora deste composto (DHINGRA, CHHILLAR & GUPTA, 2012). O AG restaura esse efeito nocivo do fluoreto de sódio por meio de sua ação antioxidante, inibindo a iniciação e/ou a propagação da peroxidação lipídica (NABAVI *et al.*, 2012). Cho *et al.* (2011) relataram a atividade inibitória da acetilcolinesterase de nanopartículas de quitosana contendo AG. No estudo de Ban *et al.* (2008) foi possível observar que o AG protegeu a neurotoxicidade induzida pela proteína β -amilóide em culturas de neurônios corticais de ratos. Sugerindo seu benefício no controle da progressão da doença de Alzheimer.

Mansouri *et al.* (2013b) investigaram o efeito do AG no comprometimento da memória induzido pela 6-hidroxidopamina e no estresse oxidativo cerebral em um modelo animal de Parkinson. Os resultados demonstraram intenso efeito neuroprotetor associado com sua significativa atividade antioxidante, fornecendo base para seu uso na prevenção e tratamento de doenças neurodegenerativas.

Apesar de todos esses benefícios, o uso do AG é restrito devido a sua pobre absorção, baixa biodisponibilidade e rápida eliminação do corpo tanto em humanos (SHAHRZAD *et al.*, 2001) como em animais (FERRUZZI *et al.*, 2009). No estudo de Del Rio *et al.* (2010), a excreção de AG em humanos alcançou apenas 4,49% da quantidade inicial ingerida. O AG se metaboliza rapidamente em seu maior metabólito 4-O-metil-ácido gálico e pirogalol, os quais são convertidos a pirogalol-1-O- β -D-glicuronídeo, 4-O-metil-ácido gálico-3-O-sulfato, 2-O-metilpirogalol-1-O- β -D-glicuronídeo, 2-O-metilpirogalol e 4-O-metil-ácido gálico. Evidenciando que o rápido metabolismo é um fator determinante para a sua baixa biodisponibilidade e rápida eliminação. Além disso, esses metabólitos possuem potencial antioxidante inferior comparado à molécula inicial (BHATTACHARYYA *et al.*, 2013).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

Obtenção e caracterização físico-química de nanopartículas de PLGA com e sem revestimento de PS80 contendo AG, além da avaliação da toxicidade sobre hemácias e manutenção de sua atividade antioxidante.

3.2 Objetivos Específicos

- a) Desenvolvimento e validação de uma metodologia analítica utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para a análise quantitativa de AG.
- b) Obtenção de formulações com nanopartículas de PLGA e PLGA com revestimento de PS80 (PLGA/PS80) contendo AG.
- c) Caracterização das formulações obtidas quanto aos seus aspectos físico-químicos.
- d) Avaliação da estabilidade física das formulações frente ao armazenamento.
- e) Verificação da toxicidade celular sobre hemácias das nanopartículas contendo AG.
- f) Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* do AG encapsulado nas nanopartículas.

4 MATERIAIS

4.1 Substâncias e Reagentes

- 2,2'-Azinobis(3-etilbenzotiazolinona-6-ácido sulfônico) (ABTS) (Sigma-Aldrich[®]).
- Acetato de etila (P.A.) (Química Moderna[®]).
- Acetonitrila (grau CLAE) (MTedia[®]).
- Ácido acético (P.A.) (Vetec[®] Química Fina).
- Ácido gálico monohidratado (pureza de 99%) (Vetec[®] Química Fina).
- Água ultrapura (sistema Milli-Q Gradiente Millipore[®], resistividade de 18,2 MΩ/cm).
- Brometo de potássio (P.A.) (Sigma-Aldrich[®]).
- Cloreto de sódio (P.A.) (Biotec[®]).
- D(+) Sacarose (P.A.) (Vetec[®] Química Fina).
- Diclorometano (P.A.) (Química Moderna[®]).
- Dimetil sulfóxido (P.A.) (Química Moderna[®]).
- Fosfato de sódio dibásico (P.A.) (Biotec[®]).
- Fosfato de sódio monobásico anidro (P.A.) (Biotec[®]).
- Poli(álcool vinílico) (peso molecular 31000 Da, grau de hidrólise 98-99%) (Sigma-Aldrich[®]).
- Poli(D,L-ácido-lático-co-glicólico) (50:50, peso molecular 30000-60000 Da) (Sigma-Aldrich[®]).
- Polissorbato 80 (Sigma-Aldrich[®]).

4.2 Equipamentos e Acessórios

- Analisador de termogravimetria e calorimetria diferencial exploratória (TA Instruments[®] - Mod. SDT Q600).
- Aparelho de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (Waters[®] Alliance) acoplado a um detector de arranjo de fotodiodo.
- Balança analítica (Bel[®] Engineering - Mod. M214A).
- Banho ultratermostático (Solab[®]).
- Bomba a vácuo (Tecnal[®] - Mod. TE 058).
- Capela para exaustão de gases (Lucadema[®]).

- Coluna cromatográfica de fase reversa C18 (125 mm x 4 mm) com tamanho de partícula 5 μm (LiChrospher[®] 100).
- Desruptor de células ultrassônico (Unique[®]).
- Difrator de raios-X (Bruker[®] - Mod. D2 Phaser).
- Equipamento de espalhamento dinâmico da luz (*Dynamic Light Scattering*) (Brookhaven[®] - Mod. 90 Plus).
- Equipamento para análise do potencial zeta (Malvern[®] - Mod. Zetasizer Nano S90).
- Espectrofotômetro UV-Vis (Jasco[®]).
- Espectrômetro de infravermelho por Transformada de Fourier (Thermo Scientific[®] - Nicolet Mod. IR200).
- Evaporador rotatório (Marconi[®] - MA 120).
- Incubadora de bancada com agitação orbital (Quimis[®] - Q816M22).
- Leitor de microplacas (Spectra[®] Max 190 - Molecular Devices).
- Liofilizador (Terroni[®] - Mod. LD1500).
- Membranas filtrantes (acetato de celulose 0,22 μm e politetrafluoretileno 0,45 μm) (Millipore[®]).
- Microscópio eletrônico de varredura com fonte emissão por efeito de campo (Tescan[®] Mod. MIRA3 LM) e sistema de recobrimento de filme condutor.
- Osmose reversa laboratorial (Vexer[®] Indústria e Comércio de Equipamentos LTDA).
- Pipetas monocal (Labmate[®]).
- Sistema de ultrapurificação de água (MilliQ Gradiente Millipore[®]).
- Ultracentrífuga refrigerada (Hermle[®] Z36HK).

5 METODOLOGIA

5.1 Desenvolvimento e Validação de Metodologia Analítica por CLAE

O desenvolvimento e a validação de uma metodologia analítica foram realizados para demonstrar que o método é apropriado e confiável para a determinação quantitativa de AG presente no sobrenadante das nanopartículas e na solução utilizada no ensaio de liberação *in vitro*.

A validação do método cromatográfico consistiu na realização de uma série de procedimentos analíticos que são preconizados pela Resolução nº 899 de 2003, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e pelo ICH topic Q2(R1) “*Validation of analytical procedures: methodology*” (2005). Portanto, por meio de estudos experimentais, deve ser garantido que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Os parâmetros analisados foram especificidade, linearidade, intervalo, precisão, limite de detecção e quantificação, exatidão e robustez (ANVISA, 2003; ICH, 2005).

5.1.1 Condições Cromatográficas

A fase móvel consistiu de acetonitrila: água: solução aquosa de ácido acético a 0,4% (50:30:20, v/v/v) em um fluxo de vazão de 0,9 mL/min. A eluição utilizada foi no modo isocrático. O volume de injeção foi de 50 µL e o comprimento de onda da leitura de 271 nm em um detector de arranjo de fotodiodo (PDA). O tempo de corrida foi de 2,5 minutos e o experimento foi realizado com temperatura controlada na coluna e amostra de 30°C e 25°C, respectivamente. A coluna cromatográfica utilizada foi de fase reversa C18 (125 mm x 4 mm) com tamanho de partícula 5 µm.

A fase móvel foi filtrada em membrana de porosidade de 0,45 µm e degaseificada em banho ultrassônico por 30 minutos.

5.1.2 Parâmetros de Validação da Metodologia Analítica

A solução padrão utilizada nas análises foi preparada em água: acetonitrila (60:40, v/v), na concentração de 1 mg/mL de AG. A partir da solução padrão foram preparados padrões com concentrações menores (10; 20; 30; 40; 50; 60; 70; 80; 0,4; 0,6; 0,8; 1 e 2

$\mu\text{g/mL}$) diluídos na solução de água: acetonitrila (60:40, v/v), em triplicata ou quadruplicata. Todas as soluções foram filtradas por meio de um filtro com tamanho de porosidade de 0,22 μm .

5.1.2.1 Linearidade

Para comprovar a linearidade do método, foi construída uma curva de calibração. As concentrações dos padrões utilizadas na curva foram de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80 $\mu\text{g/mL}$. Cada ponto da curva analítica foi analisado em triplicata e a linearidade foi avaliada pelo método de regressão linear. Além dos coeficientes de regressão a e b, também foi calculado o coeficiente de correlação (r), que permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão dos pontos experimentais.

5.1.2.2 Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma mesma amostra (ANVISA, 2003). Foram analisadas as precisões intra-corrída ou repetibilidade e inter-corrída ou precisão intermediária. Para estas análises foram utilizados padrões com concentrações de 10, 40 e 80 $\mu\text{g/mL}$, em quadruplicata. A precisão intra-corrída foi realizada no mesmo dia em um curto período de tempo e a precisão inter-corrída em três dias diferentes. A precisão foi expressa como desvio padrão relativo (DPR) segundo a Equação 1.

$$\text{DPR} = \text{DP} / \text{CMD} \times 100 \quad \text{(Equação 1)}$$

Onde, DP é referente ao desvio padrão e CMD à concentração média determinada.

5.1.2.3 Exatidão

A exatidão é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro (ANVISA, 2003). Foram analisados padrões com concentrações de 10, 40 e 80 $\mu\text{g/mL}$, em quadruplicata. A exatidão foi expressa pelo DPR e pela porcentagem de recuperação da quantidade de AG adicionado à amostra segundo a Equação 2.

$$\% \text{ Recuperação} = \text{CMD} / \text{CT} \times 100 \quad \text{(Equação 2)}$$

Onde, CMD é a concentração média determinada experimentalmente e CT a concentração teórica.

5.1.2.4 Especificidade

Especificidade é a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes (impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz) (ANVISA, 2003). Foi considerado como possível interferente da formulação de nanopartículas, o poli(álcool vinílico) (PVA). Para isso, uma análise foi realizada para uma solução aquosa de PVA a 0,5% (v/v) nas mesmas condições de diluição que o AG, água: acetonitrila (60:40, v/v). O tempo de retenção e o formato do pico foram comparados aos padrões de AG.

5.1.2.5 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Limite de detecção (LD) é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, e o limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade que pode ser quantificada pelo método analítico (ANVISA, 2003). Uma curva padrão foi construída a partir das seguintes concentrações 0,4; 0,6; 0,8; 1 e 2 µg/mL. O LD e o LQ foram determinados por meio das Equações 3 e 4,

$$\text{LD} = \text{DP}_a / \text{IC} \times 3 \quad \text{(Equação 3)}$$

$$\text{LQ} = \text{DP}_a / \text{IC} \times 10 \quad \text{(Equação 4)}$$

Onde, DP_a é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y e IC é a inclinação da curva de calibração.

5.1.2.6 Robustez

A robustez do método analítico é a medida de sua capacidade em resistir à pequenas variações dos parâmetros analíticos, indicando sua confiança durante o uso normal (ANVISA,

2003). Os parâmetros alterados foram fase móvel (acetonitrila: água: ácido acético 0,4%; 53:27:20, v/v/v); fluxo de vazão da fase móvel (0,85 e 0,95 mL/min) e temperatura da coluna (25°C). O resultado deste ensaio foi expresso em porcentagem de recuperação e DPR. Nas análises foram utilizados padrões com concentrações de 10, 40 e 80 µg/mL, em triplicata.

5.2 Obtenção de Nanopartículas de PLGA e PLGA/PS80 contendo AG

As nanopartículas foram obtidas pela técnica de emulsificação-evaporação do solvente por meio de uma emulsão simples óleo em água (O/A) (VANDERHOFF, EL-AASSER & UGELSTAD, 1979). A fase oleosa consistiu em 50 mg de PLGA e 10 mg AG dissolvidos em 1 mL de diclorometano, 0,7 mL de acetato de etila e 0,3 mL de dimetilsulfóxido. A fase aquosa foi constituída de 6 mL de uma solução aquosa de PVA a 0,5% (v/v). A fase oleosa foi vertida na fase aquosa e emulsionada por meio de sonicação durante 5 minutos. Em seguida, o solvente orgânico foi removido por meio da evaporação sob pressão negativa (600 mmHg, 37°C) por 30 minutos.

O fármaco não encapsulado foi separado das nanopartículas por meio da ultracentrifugação a 15500 rpm por 30 minutos, a 4°C. As nanopartículas resultantes foram ressuspendidas em água e ultracentrifugadas novamente nas mesmas condições, para remover os resquícios que ainda pudessem estar presentes de PVA e solvente orgânico. Os sobrenadantes obtidos das duas ultracentrifugações foram armazenados em temperatura de 8°C para posterior análise.

Para as nanopartículas de PLGA/PS80, o revestimento foi adicionado após a lavagem das nanopartículas e a retirada do segundo sobrenadante conforme descrito por Mittal *et al.* (2011) com pequenas modificações. Uma solução aquosa de PS80 na concentração de 1%, v/v (1 mL) foi adicionada às nanopartículas resultantes e mantidas em agitação a 300 rpm, por 30 minutos, a 37°C. A solução final foi ultracentrifugada a 15500 rpm por 30 minutos, a 4°C. Os sobrenadantes obtidos das três ultracentrifugações foram armazenados em temperatura de 8°C para posterior análise.

Ambas as formulações de nanopartículas, com revestimento ou não, foram ressuspendidas em 400 µL de uma solução aquosa de sacarose a 5% (p/v) e armazenadas em temperatura de -20°C. A sacarose atua como um crioprotetor, visto que as nanopartículas foram armazenadas em temperatura baixa. Para alguns testes de caracterização físico-química, as nanopartículas foram posteriormente liofilizadas.

Nanopartículas vazias, ou seja, sem o encapsulamento do AG, foram preparadas pelo mesmo protocolo acima descrito. Tal formulação é necessária para alguns testes de caracterização e ensaios *in vitro*.

5.3 Caracterização Físico-Química das Nanopartículas

5.3.1 Determinação da Eficiência de Encapsulação do Fármaco

A eficiência de encapsulação do AG foi determinada pelo método indireto. A quantidade de AG foi analisada nos sobrenadantes resultantes do processo de ultracentrifugação e a partir desse resultado foi possível estimar a quantidade de AG presente nas nanopartículas conforme a Equação 5. O sobrenadante foi diluído (1:20, v/v) em água: acetoneitrila (60:40, v/v) e analisado pelo método cromatográfico validado previamente.

$$EE = C_I - C_S / C_I \times 100 \quad \text{(Equação 5)}$$

Onde, C_I é a concentração inicial adicionada de AG e C_S é a concentração de AG presente no sobrenadante das nanopartículas. EE se refere à eficiência de encapsulação calculada representada em porcentagem.

5.3.2 Análise do Diâmetro Médio, Distribuição de Tamanho e Índice de Polidispersão

Para esta análise foi utilizada a metodologia de espectroscopia de correlação de fótons, também conhecida como *Dynamic Light Scattering* (DLS), que possibilita a determinação do raio hidrodinâmico das partículas em suspensão (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). O DLS além de verificar o tamanho das nanopartículas, também analisa seu estado de agregação (EZHILARASI *et al.*, 2013).

Uma alíquota da suspensão das nanopartículas foi dispersa em água ultrapura (1:400, v/v) e analisada com ângulo de espalhamento de 90°, a 25°C com comprimento de onda do laser de 532 nm. A leitura de cada amostra foi realizada em triplicata e o resultado expresso como a média do tamanho e índice de polidispersão. A média final e o desvio padrão foram calculados de dez amostras diferentes.

5.3.3 Determinação do Potencial Zeta

O potencial zeta reflete o potencial de superfície das partículas, o qual é influenciado pelas mudanças na interface com o meio dispersante (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Este parâmetro foi determinado utilizando-se a técnica de eletroforese. As medidas foram realizadas em triplicata a partir de uma alíquota das nanopartículas diluídas em água ultrapura (1:10, v/v). O potencial na célula eletroforética estabelecido foi de ± 150 mV.

5.3.4 Difração de Raios-X

A determinação da cristalinidade, parâmetros de rede cristalina, e medidas mais específicas, como tensão residual, tamanho de cristalitos e textura podem ser obtidas através da difração de raios-X (DR-X) (ERDÓCIA, 2011). Portanto, difratogramas foram obtidos a partir de amostras de AG livre, nanopartículas de PLGA e PLGA/PS80, nanopartículas de PLGA e PLGA/PS80 contendo AG. Os parâmetros utilizados com radiação de $\text{CuK}\alpha$ foram corrente de 10 mA, comprimento de onda de 1,54 Å, tensão de 30 kV, sendo a varredura realizada em um ângulo de 2θ , com uma velocidade de 0,05°/min, a partir de 10° a 70°.

5.3.5 Espectroscopia na Região do Infravermelho

A espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FT-IR) pode ser utilizada para a detecção e identificação de compostos e grupos funcionais. O espectro de infravermelho pode ser visto como uma impressão digital do composto (IURCKEVICZ, 2014). As amostras consistiram em nanopartículas de PLGA e PLGA/PS80 contendo AG, PLGA e PLGA/PS80 sem o fármaco, o AG livre e a mistura física do polímero com o fármaco. Todas as amostras foram preparadas em pastilhas de brometo de potássio (KBr) sendo a faixa analisada de 400 a 4000 cm^{-1} . Os espectros de infravermelho obtidos foram avaliados e comparados entre si.

5.3.6. Calorimetria Exploratória Diferencial e Termogravimetria

Para esta análise, medidas simultâneas de calorimetria exploratória diferencial (DSC) e termogravimetria (TG) foram realizadas. As amostras consistiram em AG livre, nanopartículas de PLGA e PLGA/PS80 e nanopartículas contendo AG, tanto de PLGA como

de PLGA/PS80. As amostras foram pesadas (10 mg) em cápsulas de alumínio hermeticamente fechadas, aquecidas em atmosfera de nitrogênio, de 30 a 450°C, em uma razão de aquecimento de 10°C/min e com vazão média do gás de arraste de 100 mL/min.

Os valores de entalpia (ΔH) foram fornecidos pelo programa computacional do equipamento de DSC e TG, com base na massa da amostra informada. Além disso, foram realizados cálculos de perda de massa utilizando o mesmo programa operacional, por meio da curva termogravimétrica derivada (DTG).

5.3.7 Análise Morfológica

A caracterização morfológica das nanopartículas de PLGA e PLGA/PS80 contendo AG foi realizada por meio da microscopia eletrônica de varredura com fonte emissão por efeito de campo (MEV-FEG) utilizando uma tensão de aceleração de 5,0 kVa. As partículas das amostras foram recobertas com ouro usando o equipamento de recobrimento com 10 mA por 2 minutos.

5.3.8 Estudo de Liberação *in vitro*

O perfil de liberação *in vitro* das nanopartículas de PLGA e PLGA/PS80 foi avaliado suspendendo uma quantidade específica de nanopartículas que continham 1 mg de AG em 5 mL de uma solução aquosa de PS80 a 1% (m/v). As nanopartículas dissolvidas nessa solução receptora foram incubadas em tubos sob agitação de 150 rpm e temperatura controlada de 37°C. Em intervalos pré-determinados as soluções foram submetidas à ultracentrifugação de 15500 rpm, a 4°C, por 15 minutos. Os sobrenadantes resultantes foram armazenados para a quantificação pelo método cromatográfico validado previamente. Os precipitados foram ressuspendidos na solução receptora e incubados novamente. A análise do perfil de liberação foi realizada pelo período de 5 dias, onde durante todo o período as condições *sink* foram mantidas, de forma que a concentração de AG não alcançasse mais do que 10% de sua solubilidade máxima no meio receptor. A solubilidade máxima encontrada experimentalmente do AG no meio receptor foi de 10 mg/mL. O resultado final foi expresso como porcentagem acumulada de AG liberado em função do tempo. O ensaio foi realizado em triplicata.

Os perfis de liberação obtidos foram analisados matematicamente pelo ajuste dos dados experimentais aos modelos de ordem zero, primeira ordem, Higuchi e segunda ordem, além do expoente n de liberação segundo o modelo semi-empírico de Korsmeyer-Peppas

conforme as equações descritas na Tabela 1 através do programa Scientist[®] (MicroMath Scientific Software, Inc.) (RITGER & PEPPAS, 1987; SIEPMANN & PEPPAS, 2001).

Tabela 1 - Equações matemáticas para os modelos utilizados para descrever as características de liberação de nanopartículas de AG.

Modelo	Equação
Ordem Zero	$C_t = C_0 + kt$
Primeira Ordem	$C_t = 100 (1 - e^{-kt})$
Higuchi	$C_t = k \sqrt{t}$
Segunda Ordem	$C_t = 100 [1 - (Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t})]$
Korsmeyer-Peppas	$F_t = at^n$

C_t : quantidade do fármaco liberado no tempo t ; C_0 : quantidade inicial do fármaco; k , α , β : constantes cinéticas de dissolução; A , B : concentrações iniciais do fármaco nas diferentes fases do sistema; F_t : fração do fármaco liberado no tempo t ; a : constante que incorpora as características estruturais e geométricas da forma farmacêutica. n : expoente de liberação que é indicativo do mecanismo de liberação.

5.4 Estudo de Estabilidade das Nanopartículas frente ao Armazenamento

As nanopartículas de PLGA e PLGA/PS80 contendo AG ressuspendidas em sacarose a 5%, foram analisadas quanto a sua estabilidade armazenadas congeladas ($-20 \pm 2^\circ\text{C}$) e em temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$), ambas ao abrigo de luz. Características como tamanho médio, índice de polidispersão e potencial zeta foram analisadas nos períodos de 0, 1, 2, 3, 4, 8 e 12 semanas. As análises foram realizadas em triplicata.

5.5 Caracterização Biológica das Nanopartículas

5.5.1 Avaliação da Toxicidade Celular sobre Hemácias - Ensaio *ex vivo*

O sangue foi coletado de voluntários saudáveis segundo o protocolo aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual do Centro-Oeste (Registro n.º. 501.330/2013) (ANEXO 1), dentro de tubos contendo heparina. O sangue heparinizado foi centrifugado por 5 minutos a 2500 rpm, a 4°C , sendo o sobrenadante removido e descartado. As hemácias foram lavadas três vezes com tampão fosfato de sódio (PBS) (cloreto de sódio a 0,85%, p/v), pH 7,4, na concentração de 10 mM, sendo adicionados 1,08 mg/mL de glicose para conservar a integridade dessas células, 0,3 mg/mL de penicilina G e 0,5 mg/mL de estreptomicina para

evitar a contaminação microbiana. As hemácias foram diluídas neste tampão até se alcançar a concentração do hematócrito de 2% (JAIN, RAINS & JONES, 2006).

Posteriormente, a suspensão foi incubada com o fármaco livre dissolvido em PBS nas concentrações de 80, 40 ou 20 $\mu\text{g/mL}$, ou com as nanopartículas de PLGA ou PLGA/PS80 contendo AG nas mesmas concentrações. Em tempos determinados (24, 48 ou 72 h), uma alíquota da suspensão de cada amostra foi removida e centrifugada por 5 minutos a 2500 rpm, a 4°C. Os sobrenadantes obtidos foram analisados pela medida da absorbância da hemoglobina liberada em 540 nm. A porcentagem de hemólise foi calculada conforme a Equação 6:

$$\% \text{ Hemólise: } Ab_a / Ab_c \times 100 \quad \text{(Equação 6)}$$

Onde, Ab_a é a absorbância da amostra e Ab_c , a absorbância da amostra tratada com água deionizada, representando 100% de hemólise (TORRADO *et al.*, 2008).

5.5.2 Determinação da Atividade Antioxidante *in vitro*

A capacidade antioxidante do AG e das nanopartículas de PLGA e PLGA/PS80 contendo AG foi avaliada pela medida colorimétrica do cromógeno do radical ABTS•+ como descrito inicialmente por Re *et al.* (1999) com algumas modificações. O ABTS•+ foi gerado pela incubação de 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico) (ABTS) (7 mM) com persulfato de potássio (140 mM) em água ultrapura. A solução foi estocada em temperatura ambiente, com ausência de luz por pelo menos 12 h. Depois desse período, a solução resultante foi diluída em tampão fosfato de sódio (PB), pH 7,4, até alcançar a absorbância de $0,80 \pm 0,05$ em 734 nm. As amostras de AG, nanopartículas de PLGA e PLGA/PS80 contendo AG nas concentrações de 15,62 $\mu\text{g/mL}$, 7,81 $\mu\text{g/mL}$ e 3,90 $\mu\text{g/mL}$, foram incubadas em temperatura controlada de 37°C com agitação de 150 rpm. Em tempos determinados (1, 2, 4, 8, 24 e 48 h), alíquotas das amostras foram adicionadas à solução diluída de ABTS•+ e a absorbância medida em 734 nm. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição, conforme a Equação 7.

$$\% \text{ de Inibição} = A_c - A_a / A_c \times 100 \quad \text{(Equação 7)}$$

Onde, A_c é absorbância do controle e A_a , a absorbância da amostra analisada.

5.6 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. As comparações estatísticas foram analisadas pela análise de variância (ANOVA) com 95% de confiança. Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p \leq 0,05$.

Nas análises da eficiência de encapsulação, tamanho médio e índice de polidispersão, o teste t de *Student* pareado foi utilizado para a comparação entre as duas formulações de nanopartículas, sendo consideradas significativas as diferenças quando $p \leq 0,05$.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Desenvolvimento e Validação de Metodologia Analítica por CLAE

6.1.1 Condições Cromatográficas

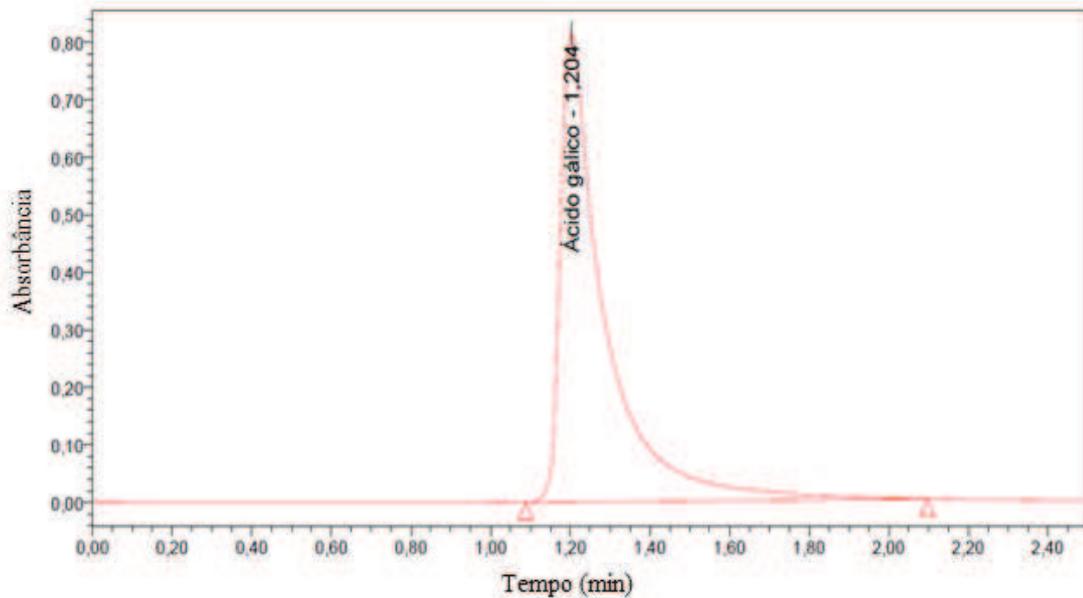
Na literatura existem alguns métodos para a quantificação de AG por CLAE, assim os testes iniciais para a determinação das condições cromatográficas foram baseados nestes estudos. Primeiramente foi utilizado como fase móvel metanol e ácido acético a 0,1% (v/v) nas proporções especificadas por Sawant, Prabhakar & Pandita (2010), onde não foram obtidos bons resultados, assim, a proporção foi alterada, o ácido foi retirado e substituído por água em diversas proporções, mas picos característicos do AG não foram encontrados. Alguns autores utilizaram acetonitrila e água (10:90, v/v) como fase móvel, e outros acetonitrila, água e ácido acético (90:10:0,2, v/v) (NGUYEN *et al.*, 2013; PARDESHI, DHODAPKAR & KUMAR, 2014). Levando em consideração estas condições, testes foram realizados com estes solventes e picos irregulares foram conseguidos. Picos simétricos foram obtidos quando a quantidade de acetonitrila no sistema foi mantida na proporção de 50:50 (v/v) em relação à água. Picos com absorbâncias altas só foram encontrados quando o ácido acético foi adicionado ao sistema, sendo a concentração ideal de 0,4% em água (v/v).

Portanto, a fase móvel que resultou um pico mais estreito e simétrico e com a linha de base sem ruídos, foi acetonitrila, água e solução aquosa de ácido acético a 0,4% (50:30:20, v/v/v). O preparo da amostra também influenciou na absorbância alcançada, tendo em vista que a amostra possui uma solubilidade limitada a muitos solventes. A amostra dissolvida em água e acetonitrila (60:40, v/v) apresentou melhores resultados. O comprimento de onda escolhido foi de 271 nm, pois é um dos picos de maior absorção do AG, condizente com o trabalho de Deshmukh & Prabhu (2011) que utilizaram o mesmo comprimento.

Nestas condições, o tempo de corrida foi de 2,5 minutos, pois o tempo de retenção observado para o AG foi de aproximadamente 1,2 minutos (Figura 6). Tempo este considerado curto o suficiente, facilitando as análises posteriores. Na literatura os tempos de retenção obtidos variaram de 3,23 a 6,55 min (SHENG *et al.*, 2005; KARAMAC, KOSINSKA & PEGG, 2006; PARDESHI, DHODAPKAR & KUMAR, 2014) e de 10,1 a 14,6 min (DÍEZ *et al.*, 2008; SAWANT, PRABHAKAR & PANDITA, 2010; DESHMUKH & PRABHU, 2011; NGUYEN *et al.*, 2013). Todas as condições cromatográficas estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2 - Condições cromatográficas padronizadas para a quantificação de AG.

Parâmetro	Condições Cromatográficas
Fase Móvel	Acetonitrila: água: ácido acético 0,4% (50:30:20, v/v/v)
Fluxo de Eluição	0,9 mL/minuto
Deteção	$\lambda = 271 \text{ nm}$
Volume de Injeção	50 μL
Temperatura na Coluna	30°C
Temperatura na Amostra	25°C
Tipo da Coluna	Fase reversa C18 (125 mm x 4 mm)

Figura 6 - Cromatograma representativo (absorbância em função do tempo da solução padrão de AG 40 $\mu\text{g/mL}$. Fase móvel acetonitrila: água: ácido acético 0,4% (50:30:20, v/v), em 271 nm.

6.1.2 Parâmetros de Validação da Metodologia Analítica

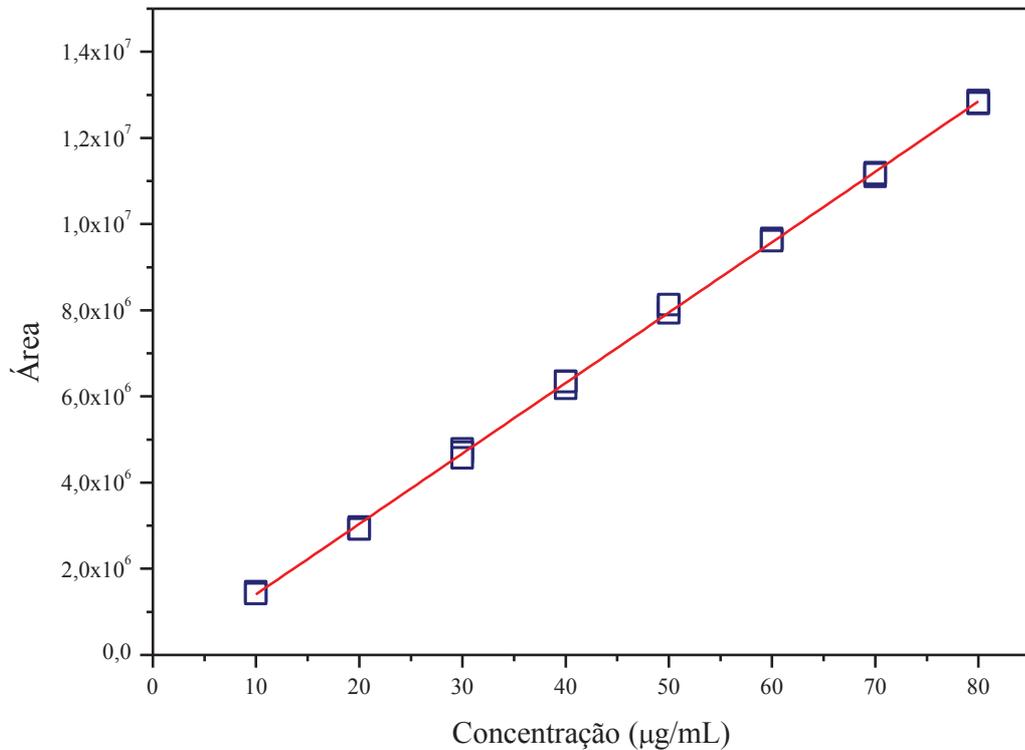
6.1.2.1 Linearidade

A linearidade foi avaliada pela curva analítica a partir de oito concentrações de AG (Figura 7). Esta análise gerou um coeficiente de correlação (r) igual a 0,9997 e a equação dada por:

$$y = 1,63 \cdot 10^5 x - 2,27 \cdot 10^5 \quad \text{(Equação 8)}$$

Onde, y representa a área do pico e x a concentração de AG expressa em $\mu\text{g/mL}$.

Figura 7 - Curva analítica do AG em acetonitrila: água (60:40, v/v). Fase móvel: acetonitrila: água: ácido acético 0,4%, (50:30:20, v/v/v), em 271 nm (n=3).



Um coeficiente de correlação maior que 0,999 evidencia um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão. A ANVISA (2003) recomenda um coeficiente de correlação igual ou maior que 0,99. Portanto, pode-se observar uma completa linearidade do sistema, visto que o coeficiente de correlação encontrada foi superior ao estimado pela ANVISA e ficou muito próximo de 1.

6.2.2.2 Precisão

Três concentrações de AG baixa, média e alta (10, 40 e 80 $\mu\text{g/mL}$) foram preparadas em quadruplicada e analisadas no mesmo dia para avaliar a precisão intra-corrída ou em três dias diferentes para a precisão inter-corrída. O resultado expresso como DPR está apresentado na Tabela 3. O método demonstrou ser preciso, pois todos os valores de DPR se apresentaram inferiores a 5%, que é o máximo que a ANVISA (2003) preconiza.

Tabela 3 - Precisões intra-corrída e inter-corrída.

PRECISÃO INTRA-CORRIDA						
Solução Padrão ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração Quantificada ($\mu\text{g/mL}$)				DP	DPR (%)
10	10,88	10,94	10,94	10,86	0,04	0,36
40	39,64	39,82	39,70	39,78	0,07	0,19
80	80,74	80,32	80,64	80,61	0,18	0,22
PRECISÃO INTER-CORRIDA						
Solução Padrão ($\mu\text{g/mL}$)	Média da Concentração Quantificada \pm DP ($\mu\text{g/mL}$) (n=4)			DP	DPR (%)	
	1º dia	2º dia	3º dia			
10	10,87 \pm 0,05	11,04 \pm 0,13	10,90 \pm 0,04	0,08	0,79	
40	40,13 \pm 0,11	39,79 \pm 0,11	39,73 \pm 0,07	0,21	0,54	
80	85,07 \pm 2,69	79,72 \pm 0,64	80,58 \pm 0,18	2,87	3,51	

6.2.2.3 Exatidão

Foram analisadas três concentrações diferentes de AG (10, 40 e 80 $\mu\text{g/mL}$) em quadruplicada. A exatidão expressa como porcentagem de recuperação e DPR. Os resultados estão detalhados na Tabela 4.

Tabela 4 - Resultados da exatidão para os padrões de AG.

Solução Padrão ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração Quantificada ($\mu\text{g/mL}$)				DPR (%)	Porcentagem de Recuperação (%)
10	9,84	9,94	10,01	9,95	0,39	99,70
40	40,77	40,50	40,24	40,40	0,54	101,20
80	80,99	81,11	81,32	81,36	0,21	101,50

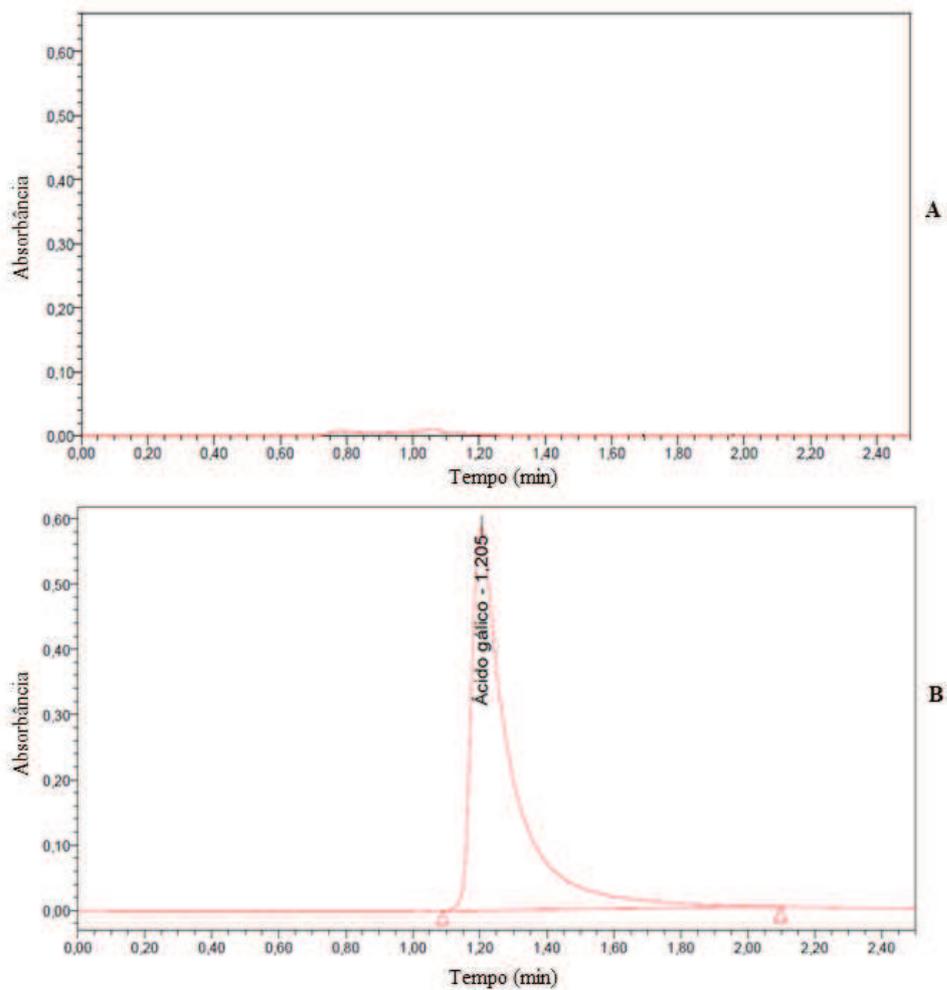
Os valores de porcentagem de recuperação obtidos ficaram entre a faixa de 99,70 e 101,50%, demonstrando que os resultados estão próximos do valor real, pois, ficaram próximos de 100% e dentro da faixa de 95 a 105%. Além de que o valor máximo de DPR alcançado foi de 0,54%, ressaltando que o valor deve ser inferior a 5%. Portanto, é possível

perceber que os resultados apresentam concordância entre os valores experimental e teórico, sendo possível afirmar que o método é exato.

6.2.2.4 Especificidade

A especificidade do método foi verificada pela leitura da amostra de uma solução aquosa de PVA a 0,5%, pois este é o principal interferente presente no sobrenadante das nanopartículas. O cromatograma originado (Figura 8A) foi comparado com os obtidos das soluções padrões de AG (Figura 8B).

Figura 8 - Cromatograma representativo (absorbância em função do tempo da solução aquosa de PVA 0,5% (A) e de uma solução padrão de AG 30 µg/mL (B). Fase móvel acetonitrila: água: ácido acético 0,4% (50:30:20, v/v), em 271 nm.



O método demonstrou ser específico para a quantificação de AG, pois o cromatograma referente à solução de PVA (0,5%) não apresentou picos significativos no tempo de retenção de 1,20 minutos do AG.

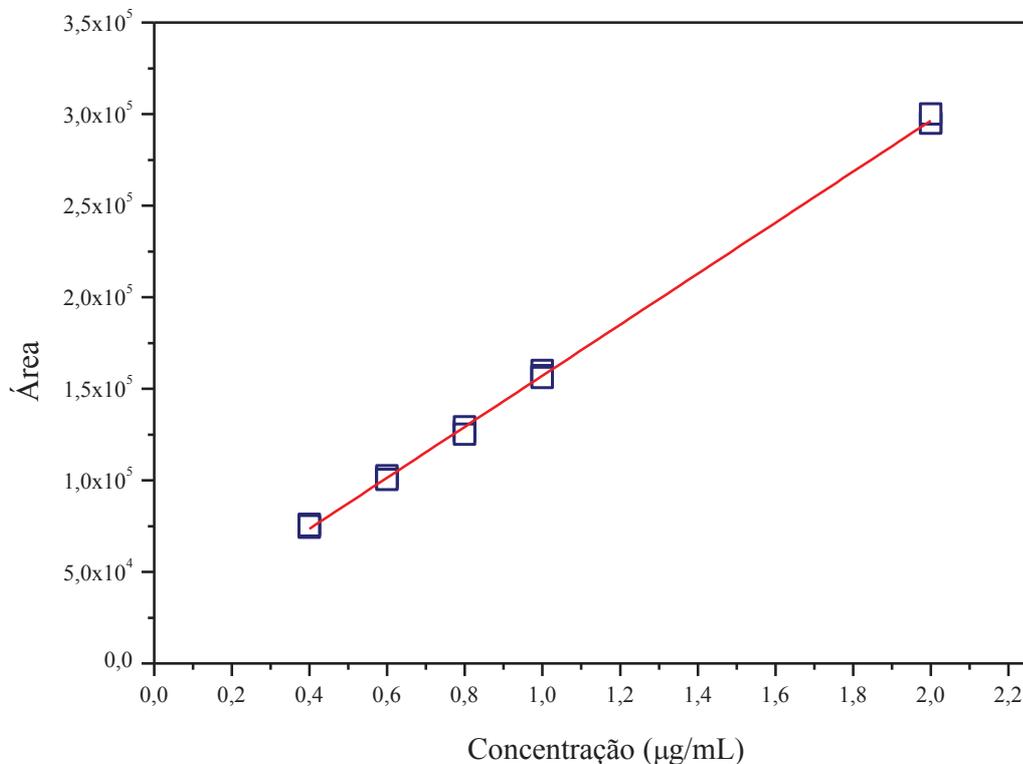
6.2.2.5 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Uma curva de calibração específica com valores de concentrações menores foi obtida. O LD e LQ foram calculados analisando o desvio padrão do intercepto com o eixo Y a inclinação da curva a partir da regressão linear (Figura 9). Esta análise gerou um valor de coeficiente de correlação de 0,9996 e a equação dada por:

$$y = 1,39.10^5x + 1,78.10^4 \quad \text{(Equação 9)}$$

Onde, y representa a área do pico e x a concentração de AG expressa em $\mu\text{g/mL}$.

Figura 9 - Curva analítica do AG em acetonitrila: água (60:40, v/v). Fase móvel: acetonitrila: água: ácido acético 0,4%, (50:30:20, v/v/v), em 271 nm (n=3).



Este valor do coeficiente de correlação de 0,9996 muito próximo de 1, demonstrou a linearidade ao método e assim a partir da curva obtida, os valores de LD e LQ puderam ser calculados. O LD encontrado foi de 23,82 ng/mL e o LQ de 79,41 ng/mL, valores que demonstram a sensibilidade do método e confiabilidade para as análises de concentrações menores do AG. O ensaio de liberação *in vitro* é uma análise que necessita de um método capaz de quantificar com confiabilidade quantidades baixas do analito. Uma amostra na concentração do LQ de 79,41 ng/mL foi preparada e analisada, o método foi possível de quantificar exatamente a mesma quantidade demonstrando sua sensibilidade. Os valores de LD e LQ do presente método foram maiores quando comparados ao estudo de Bhattacharyya *et al.* (2013), que encontraram valores de LD e LQ de 53 e 185 ng/mL, respectivamente.

6.2.2.6 Robustez

Com o intuito de analisar a robustez, algumas alterações no método cromatográfico foram realizadas, para verificar a capacidade deste de resistir a essas variações. Os resultados são apresentados na Tabela 5 e foram expressos como porcentagem de recuperação e DPR.

Tabela 5 - Porcentagem de recuperação e DPR obtido nas análises de robustez após modificações no método original (n=3).

Alterações no Método	Porcentagem de Recuperação (%) ± DPR			
	Original	10 µg/mL	40 µg/mL	80 µg/mL
Fase móvel (acetonitrila: água: ácido acético 0,4%; 53:27:20, v/v/v)		102,73 ± 0,35	98,69 ± 0,36	98,34 ± 0,15
Fluxo de 0,85 mL/min		104,60 ± 0,32	106,87 ± 0,34	107,46 ± 0,11
Fluxo de 0,95 mL/min		97,96 ± 0,32	96,91 ± 0,73	97,35 ± 0,29
Temperatura da Coluna de 25°C		100,60 ± 1,87	99,92 ± 0,34	100,74 ± 0,04

As alterações na fase móvel, fluxo para 0,95 mL/min e temperatura da coluna mantiveram a robustez do método, apresentando valores de porcentagem de recuperação entre 96,01 e 102,73% com valor máximo do DPR de 1,87%. A variação no fluxo de 0,85 mL/min demonstrou ser um parâmetro onde a resistência do método é menor, visto que neste fluxo uma maior quantidade de AG foi determinada experimentalmente quando comparada à concentração real. Os valores de porcentagem de recuperação ficaram entre 104,60 e

107,46%, valores distantes de 100%. O ideal é que os resultados se encontrem na faixa de 95 a 105%.

6.2 Obtenção de Nanopartículas de PLGA e PLGA/PS80 contendo AG

O PLGA é um copolímero aprovado pelo FDA para uso humano, sendo escolhido para o presente estudo devido a sua biocompatibilidade, estabilidade nos fluidos biológicos e tempo de circulação prolongado (XIE *et al.*, 2008; KISS *et al.*, 2014). É possível controlar sua taxa de degradação pela proporção de ácido lático e glicólico presentes no polímero, a proporção utilizada foi de 50:50, a mais comum em muitos estudos (CHEREDDY *et al.*, 2014; KISS *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2014). Silva *et al.* (2014) e Courant *et al.* (2009) obtiveram nanopartículas com tamanhos menores utilizando o PLGA 50:50 quando comparado ao 65:35, parâmetro importante a ser considerado na escolha do polímero.

O método de emulsificação-evaporação do solvente é o mais comum utilizado para produzir nanopartículas de PLGA (ALSHAMSAN, 2014). O AG apresenta uma solubilidade teórica relativamente alta na água (10 mg/mL $\log P = -0,53 \pm 0,05$), o que dificulta seu encapsulamento em nanopartículas poliméricas (LU *et al.*, 2006). O AG possui solubilidade maior em metanol e etanol e menor em acetato de etila (DANESHFAR, HASSAN & HOMAYOUN, 2008).

Quando o fármaco apresenta características hidrossolúveis, recomenda-se o método de emulsificação-evaporação com emulsão múltipla (SON *et al.*, 2009; VARSHOCHIAN *et al.*, 2013; ZAKERI-MILANI *et al.*, 2013). Para o AG foram desenvolvidas algumas formulações por esse método, porém a maior eficiência de encapsulação alcançada foi de $13,87 \pm 1,26\%$ (n=3). Outra metodologia testada foi a de nanoprecipitação, porém ainda assim, eficiências de encapsulação baixas foram conseguidas, de $13,09 \pm 6,64\%$ (n=3).

Portanto, preferiu-se otimizar uma formulação utilizando a metodologia de emulsificação-evaporação do solvente com emulsão simples, onde eficiências de encapsulação acima de 20% foram alcançadas. A emulsão simples é composta de uma fase oleosa e uma fase aquosa. A fase aquosa é constituída por um tensoativo que é necessário para a preparação e estabilização das nanopartículas, pois facilitam a emulsificação devido a sua atividade interfacial (MONTESINOS *et al.*, 2012). Desse modo, o tensoativo possui duas funções básicas em uma solução aquosa: a) a adsorção e a redução da tensão superficial e b) micelização (ZHOU *et al.*, 2008).

O tensoativo escolhido para o preparo das nanopartículas foi o PVA. Sabe-se que em altas concentrações de PVA, a tensão interfacial é diminuída resultando em partículas menores. Concluindo que a concentração de PVA é inversamente proporcional ao tamanho das nanopartículas como observado por Mainardes & Evangelista (2005), onde o aumento de PVA de 0,15 para 0,7% (p/v) diminuiu o tamanho das partículas (345-242 nm).

Entretanto, com o aumento de PVA, a viscosidade da fase externa aquosa aumenta o que pode resultar também em tamanhos maiores. Assim, a concentração escolhida deve ser aquela intermediária, o suficiente para diminuir a tensão superficial sem alterar a viscosidade da solução. Além de que a quantidade de PVA altera diretamente a eficiência de encapsulação (SONG *et al.*, 2008). No estudo de Song *et al.* (2008) a maior eficiência conseguida foi na concentração de 0,5% (p/v), provavelmente causada pela menor difusão do fármaco livre para a fase aquosa com concentrações menores de PVA. Diferentes concentrações de PVA (0,25; 0,5; 1 e 2%) e volumes (6 e 10 mL) foram analisados, sendo a quantidade de PVA determinada no presente trabalho com resultados mais favoráveis de 6 mL na concentração de 0,5% (p/v).

A fase oleosa é constituída pelo polímero, fármaco e solventes orgânicos. O AG apresenta alta solubilidade em dimetilsulfóxido e o PLGA em diclorometano, por isso ambos os solventes foram constituintes essenciais da formulação. Sabe-se que a adição de acetato de etila diminui o tamanho das nanopartículas, fato este que foi verificado nas formulações contendo AG e por isso, tal componente foi adicionado à formulação (MAINARDES & EVANGELISTA, 2005; RAO & GECKELER, 2011).

O tempo de sonicação também interfere no tamanho obtido das nanopartículas, quanto maior o tempo, menor o tamanho das partículas, porém, o índice de polidispersão pode aumentar o que representa uma distribuição de tamanho maior (KHUROO *et al.*, 2014). Portanto, o tempo de sonicação onde foram obtidas nanopartículas com tamanho e índice de polidispersão ideais foi de 5 minutos.

O último parâmetro a ser analisado foi a proporção entre o AG e o PLGA, duas proporções foram estudadas 1:10 e 1:5. A proporção comum relatada em diversos estudos é a de 1:10 do fármaco em relação ao polímero, porém o AG apresenta características que dificultam seu encapsulamento. Por isso, preferiu-se aumentar a quantidade de AG em relação ao PLGA, na proporção de 1:5, o que resultou em maior quantidade de AG nas nanopartículas, causando economia do polímero e de outros componentes da formulação.

Levando em consideração a interferência de cada componente da formulação nos parâmetros como tamanho, eficiência de encapsulação e distribuição, a composição da melhor formulação obtida está listada na Tabela 6.

Tabela 6 - Parâmetros para a formulação final das nanopartículas de AG.

	Quantidade dos Componentes
Fase Oleosa	50 mg de PLGA 10 mg de AG 1 mL de diclorometano 700 µL de acetato de etila 300 µL de dimetilsulfóxido
Fase Aquosa	6 mL de PVA 0,5%
Tempo de Sonicação	5 minutos

6.3 Caracterização Físico-Química das Nanopartículas

6.3.1 Determinação da Eficiência de Encapsulação do Fármaco

A eficiência de encapsulação do AG foi determinada indiretamente pela leitura dos sobrenadantes por meio do método previamente validado por CLAE. As nanopartículas de PLGA contendo AG apresentaram eficiência de encapsulação de $27,06 \pm 3,54\%$ e as nanopartículas de PLGA/PS80 de $25,33 \pm 4,94\%$ (Tabela 7).

Tabela 7 - Eficiência de encapsulação e quantidade de AG encapsulado às nanopartículas (n=10).

Formulações	Eficiência de Encapsulação (Média ± DP %)	AG Encapsulado às Nanopartículas (Média ± DP mg)
Nanopartículas de PLGA contendo AG	$27,06 \pm 3,54^a$	$2,70 \pm 0,35^a$
Nanopartículas de PLGA/PS80 contendo AG	$25,33 \pm 4,94^a$	$2,53 \pm 0,49^a$

^a médias ± desvio padrão (n=10) analisadas por coluna, onde letras iguais significam igualdade estatística e letras diferentes desigualdade estatísticas (Teste t de *Student* pareado e α 0,05).

Ambas as formulações apresentaram baixa eficiência de encapsulação, porém condizente com a solubilidade do AG de 10 mg/mL em água, sugerindo que este fármaco possui características hidrofílicas. Sabe-se que a encapsulação de compostos hidrofílicos constitui um desafio devido à rápida partição do fármaco para a fase aquosa (COHEN-SELA *et al.*, 2009). Por isso, pode-se concluir que a formulação obtida foi satisfatória, visto que diferentes metodologias e solventes foram testados e a quantidade final de AG encapsulado às nanopartículas foi de $2,70 \text{ mg} \pm 0,35$ e $2,53 \text{ mg} \pm 0,49$ para as nanopartículas de PLGA e PLGA/PS80, respectivamente. Estas quantidades são adequadas levando em consideração as potentes atividades biológicas que o AG possui tais como antioxidante, neuroprotetora e antitumoral, visto que em pequenas concentrações este fármaco apresenta atividade.

6.3.2 Análise do Diâmetro Médio, Distribuição de Tamanho e Índice de Polidispersão

As nanopartículas desenvolvidas apresentaram tamanho, distribuição de tamanho e índice de polidispersão adequados para uma formulação em escala nanométrica (Tabela 8). O tamanho das nanopartículas afeta significativamente sua absorção e distribuição nos tecidos biológicos, quando administradas intravenosamente, partículas menores que 20 nm são eliminadas da circulação dentro de poucas horas, via sistema reticuloendotelial, já partículas maiores são retidas no fígado e baço dentro de minutos (ZHANG *et al.*, 2013). As nanopartículas de PLGA contendo AG e PLGA/PS80 contendo AG apresentaram tamanho médio de $223,27 \pm 11,80 \text{ nm}$ e $228,41 \pm 11,16 \text{ nm}$, respectivamente. O ideal é que as nanopartículas apresentem tamanho médio menor que 300 nm, objetivo este alcançado no presente trabalho, visto que todos os lotes produzidos apresentaram tamanho inferior a 300 nm (SILVA *et al.*, 2006).

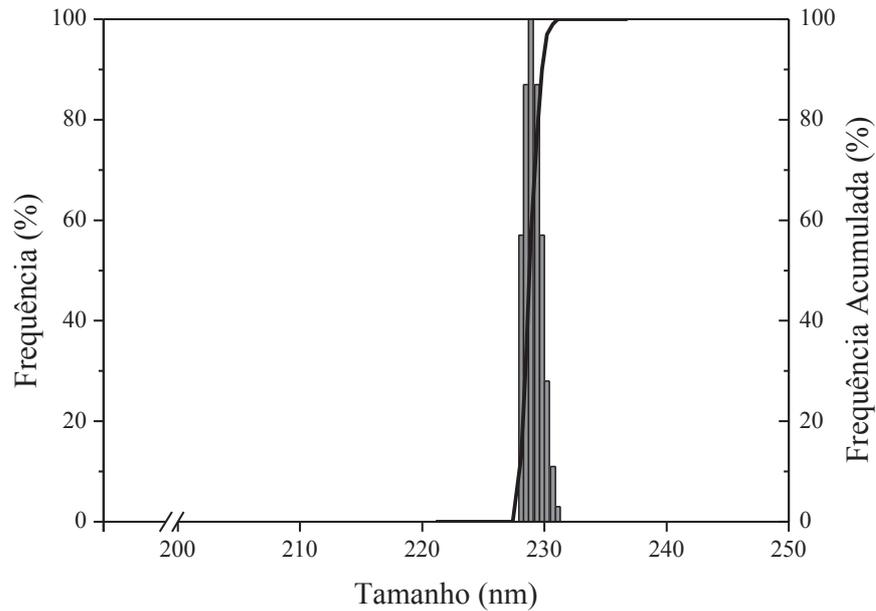
Tabela 8 - Médias do tamanho, índice de polidispersão e distribuição das nanopartículas de AG (n=10).

Formulações	Tamanho (nm) (Média ± DP)	Índice de Polidispersão (Média ± DP)	Distribuição do Tamanho (nm)
Nanopartículas de PLGA contendo AG	223,27 ± 11,80 ^a	0,06 ± 0,02 ^a	100% = 228,10- 231,10
Nanopartículas de PLGA/PS80 contendo AG	228,41 ± 11,16 ^a	0,05 ± 0,02 ^a	100% = 236,2- 238,8

^a médias ± desvio padrão (n=10) analisadas por coluna, onde letras iguais significam igualdade estatística e letras diferentes desigualdade estatísticas (Teste t de *Student* pareado e α 0,05).

O índice de polidispersão é um parâmetro que determina a dispersão das partículas, avaliando quanto o tamanho de cada nanopartícula se afastou do tamanho médio. Portanto, quanto menor o índice de polidispersão, melhor sua distribuição de tamanho, seu valor aceito é que seja inferior a 0,2. Uma condição ideal é alcançada quando o índice é menor ou igual a 0,1, neste caso o sistema é classificado como monomodal e todas as partículas do sistema possuem a mesma dimensão, demonstrando a homogeneidade da amostra (SILVA *et al.*, 2006; PORTA, CAMPARDELLI & REVERCHON, 2013). Todos os lotes produzidos apresentaram índice de polidispersão inferior ao preconizado, $0,06 \pm 0,02$ e $0,05 \pm 0,02$, confirmando o perfil monomodal de ambas as formulações desenvolvidas. Isto pode ser verificado na Figura 10, onde está representada a distribuição de tamanho de um dos lotes de nanopartículas de AG, que apresentou tamanho médio de 239,7 nm, índice de polidispersão de 0,033 e distribuição de tamanho de 100% das nanopartículas com tamanho entre 228,1 e 231,1 nm.

Figura 10 - Perfil de distribuição de um dos lotes de nanopartículas de PLGA/PS80 contendo AG.



Nagpal, Singh & Mishra (2013) desenvolveram nanopartículas de quitosana contendo AG com tamanho de $166,53 \pm 4,48$ nm, porém com um índice de polidispersão muito alto de $0,24 \pm 0,08$. Isto indica um perfil bimodal das nanopartículas, característica esta desfavorável a uma formulação. Portanto, as nanopartículas desenvolvidas neste estudo, demonstraram a efetividade e reprodutibilidade do método em produzir formulações com características como tamanho médio, distribuição e índice de polidispersão ideais para o carreamento de AG.

6.3.3 Determinação do Potencial Zeta

As nanopartículas desenvolvidas apresentaram potencial de superfície negativo, inferior a -20 mV conforme a Tabela 9. A encapsulação do AG e a presença do revestimento PS80 na superfície das nanopartículas não interferiram no potencial zeta, pois o potencial das formulações sem o encapsulamento de AG não diferiu significativamente das formulações que continham o fármaco.

Tabela 9 - Potencial zeta das formulações de nanopartículas.

Formulações	Potencial Zeta (mV)
Nanopartículas de PLGA	-23,16 ± 0,05 ^a
Nanopartículas de PLGA contendo AG	-22,18 ± 1,57 ^a
Nanopartículas de PLGA/PS80	-21,80 ± 0,60 ^a
Nanopartículas de PLGA/PS80 contendo AG	-22,50 ± 1,57 ^a

^a médias ± desvio padrão (n=3) analisadas por coluna, onde letras iguais significam igualdade estatística e letras diferentes designam diferenças estatísticas (ANOVA com pós teste Tukey e α 0,05).

Os valores negativos encontrados para as nanopartículas estão condizentes com a característica do polímero e revestimento utilizados. Especialmente os poliésteres, como o PLGA, fornecem um potencial negativo à interface de nanopartículas, e o PS80 por atuar também como um surfactante, concede um potencial negativo à superfície (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; VOIGT *et al.*, 2014).

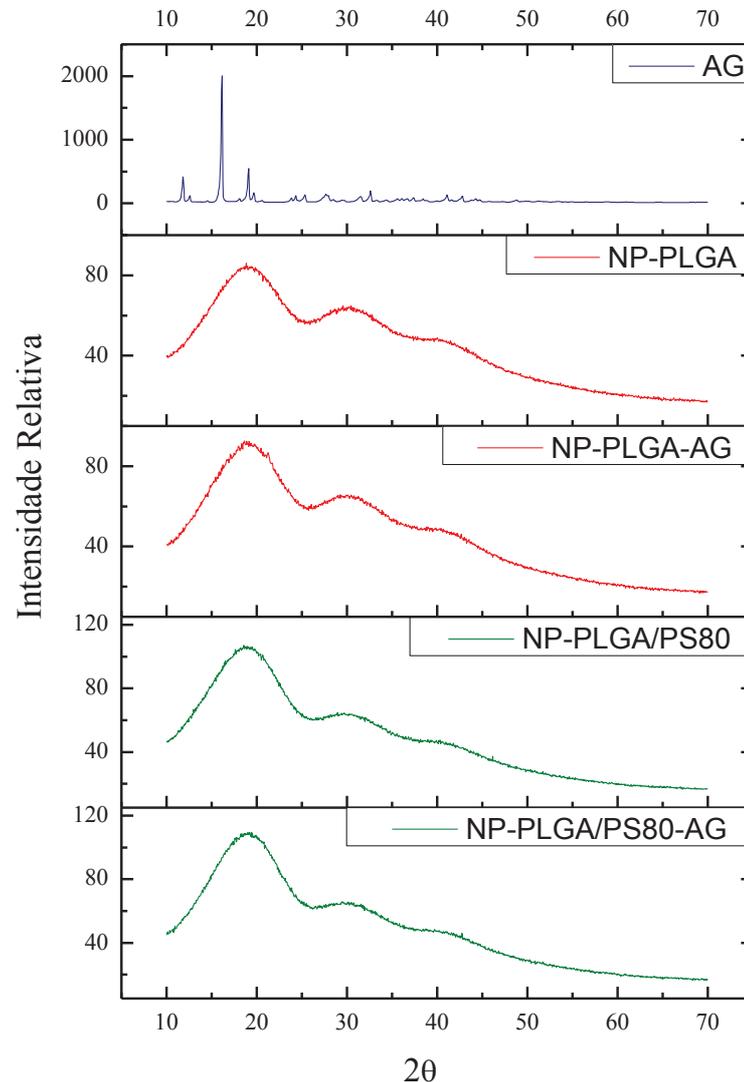
A repulsão eletrostática entre as partículas depende do valor do potencial zeta. Quanto maior o potencial, mais forte será a repulsão, e mais estável o sistema se torna. (STEVANOVIC *et al.*, 2014). Um valor que se aproxime de -30 mV ou +30 mV é importante para uma boa estabilidade a longo prazo físico-química, pois grandes forças repulsivas tendem a evitar a agregação em função das colisões ocasionais de nanopartículas adjacentes (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; STEVANOVIC *et al.*, 2014).

Além disso, a carga de superfície é importante parâmetro para determinar se as nanopartículas se aglomeram no fluxo sanguíneo, se aderem ou interagem com membranas celulares de carga oposta (KUMARI, YADAV & YADAV, 2010). Nanopartículas carregadas negativamente podem produzir uma captação eficiente, especialmente depois da adsorção ou pela ligação covalente a alvos ligantes (WOHLFART, GELPERINA & KREUTER, 2012). A partir disso, pode-se sugerir que as formulações obtidas por possuírem carga negativa mais próxima de -30 mV do que da neutralidade, irão possuir estabilidades físico-química a longo prazo e na corrente sanguínea maiores.

6.3.4 Difração de Raios-X

A DR-X é utilizada para identificar a cristalinidade de compostos sólidos, baseada na sua estrutura atômica (EZHILARASI *et al.*, 2013). Os difratogramas obtidos para o AG, nanopartículas vazias e nanopartículas contendo AG estão apresentados na Figura 11.

Figura 11 - Difratogramas do AG, nanopartículas vazias e nanopartículas contendo AG.



AG: fármaco livre; NP-PLGA: nanopartículas de PLGA; NP-PLGA-AG: nanopartículas de PLGA contendo AG; NP-PLGA/PS80: nanopartículas de PLGA/PS80; NP-PLGA/PS80-AG: nanopartículas de PLGA/PS80 contendo AG.

O difratograma do AG mostrou numerosos picos característicos distintos, indicando a presença de planos moleculares bem formados do seu cristal. Os picos identificados nos ângulos de difração foram de 11,86°, 16,3° e 18,83°, sugerindo que este se apresenta na forma cristalina. Essas características não foram observadas para o AG encapsulado em nanopartículas, indicando a completa dispersão do fármaco na matriz polimérica em seu estado amorfo. As nanopartículas de PLGA e PLGA/PS80 vazias também se apresentaram na forma amorfa.

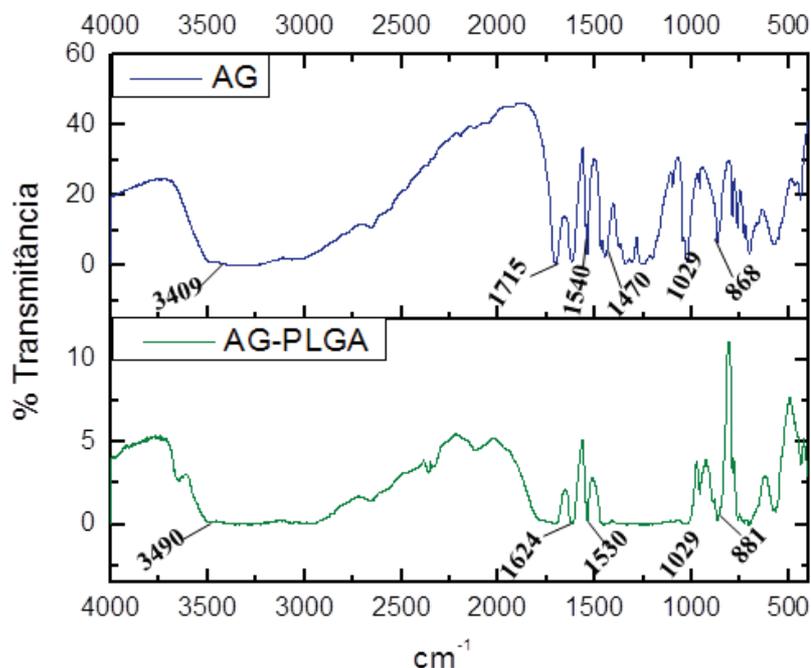
A DR-X é uma técnica que revela informações sobre a estrutura cristalográfica dos materiais. A estrutura cristalina é uma distribuição regular tridimensional de átomos no

espaço, sendo que estes estão organizados de modo a formar uma série de planos paralelos separados entre si por uma distância, que varia conforme a natureza do material (BEDÊ, 2010). Por isso, a ausência de picos de difração é uma importante condição para distinguir a forma polimorfa cristalina de uma forma amorfa. A mudança na natureza cristalina da estrutura do AG para o estado amorfo é comum no encapsulamento de fármacos, esta é uma característica favorável à formulação de nanopartículas, pois formas amorfas possuem absorção maior que as cristalinas e conseqüentemente, apresentam uma maior biodisponibilidade *in vivo* (SONAM & KUMAR, 2014).

6.3.5 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho

Foram obtidos espectros para o AG, nanopartículas de PLGA e PLGA/PS80 contendo ou não AG e a mistura física do PLGA com o AG. Os espectros do AG e da mistura física estão representados na Figura 12.

Figura 12 - FT-IR do AG e da mistura física do polímero com o fármaco.



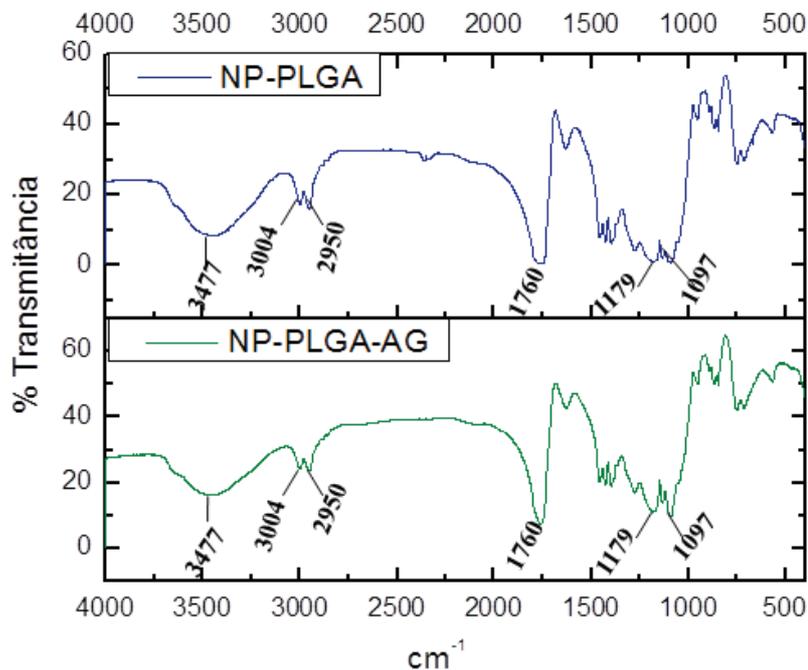
AG: fármaco livre; AG-PLGA: mistura física do AG e PLGA.

As bandas de absorção obtidas para o AG mostraram-se similares com as descritas na literatura, sendo possível identificar e interpretar algumas bandas características (BERGAMINI, 2008; LIU *et al.*, 2013). A banda em 3409 cm⁻¹ é referente à deformação axial

da ligação O-H que são ligações de hidrogênio intermoleculares, outra banda em 1715 cm^{-1} é referente à deformação axial da ligação C=O do ácido carboxílico. As bandas em 1540 e 1470 cm^{-1} se referem à deformação axial da ligação C=C do fenil, em 1029 cm^{-1} ocorre a deformação angular da ligação C-H aromática no plano e em 868 cm^{-1} a deformação angular fora do plano da ligação C-H do anel aromático com tetra-substituição em 1,3,4,5 (BERGAMINI, 2008; DELIGIANNAKIS, SOTIRIOU & PRATSINIS, 2012).

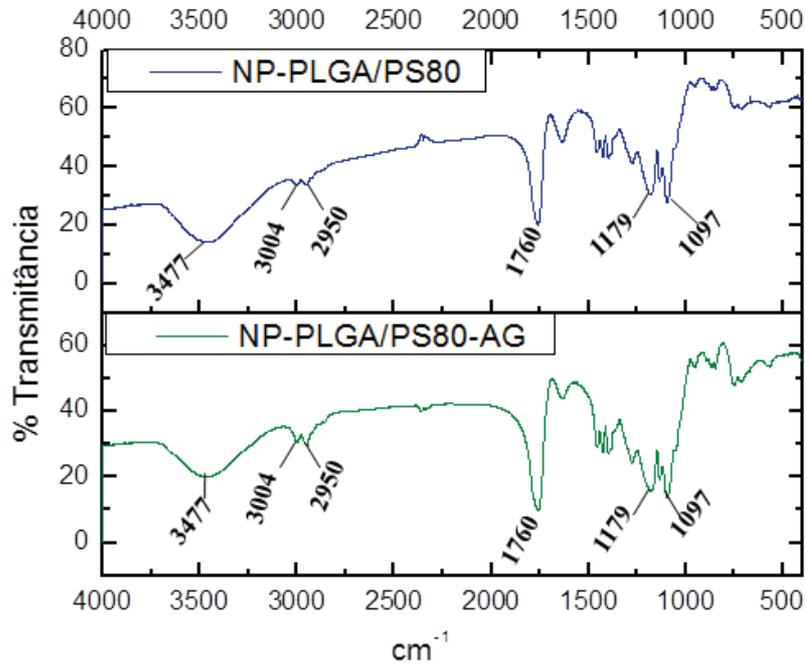
A mistura física do PLGA e AG apresenta uma banda de absorção em 3490 cm^{-1} referente à deformação axial do OH presente tanto no espectro da NP-PLGA como do AG. A banda em 1624 cm^{-1} é referente à deformação axial do grupamento C=O do PLGA, já a banda em 1530 cm^{-1} é referente à deformação axial da ligação C=C do fenil do AG. Em 1029 cm^{-1} e em 881 cm^{-1} , ambas se referem à deformações da ligação C-H do AG. Os espectros das nanopartículas de PLGA e PLGA/PS80 sem o AG e contendo AG estão apresentados nas Figuras 13 e 14.

Figura 13 - FT-IR das nanopartículas de PLGA e PLGA contendo AG.



NP-PLGA: nanopartículas de PLGA; NP-PLGA-AG: nanopartículas de PLGA contendo AG.

Figura 14 - FT-IR das nanopartículas de PLGA/PS80 e PLGA/PS80 contendo AG.



NP-PLGA/PS80: nanopartículas de PLGA/PS80; NP-PLGA-AG: nanopartículas de PLGA/PS80 contendo AG.

Os espectros das nanopartículas de PLGA e PLGA/PS80 apresentaram uma banda de absorção em 3477 cm^{-1} referente à deformação axial da hidroxila, as vibrações de estiramento das ligações simples do CH, CH₂ e CH₃ ocorrem em 2950 a 3004 cm^{-1} , em 1760 cm^{-1} ocorre deformação axial do C=O e em 1097 a 1179 cm^{-1} deformação do C-O (NATH *et al.*, 2013). Analisando o espectro da nanopartícula de PLGA e PLGA/PS80 contendo AG, verifica-se a sobreposição das bandas do PLGA nas do AG, por isso, não existe diferença entre as bandas de absorção. Devido à similaridade dos espectros das nanopartículas vazias com as nanopartículas contendo o AG, sugere-se que ocorreu uma distribuição molecular do AG na estrutura polimérica do sistema carreador.

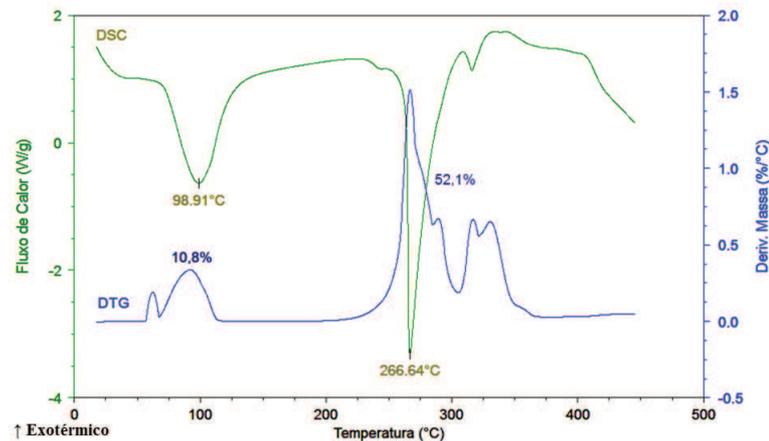
6.3.6 Calorimetria Exploratória Diferencial e Termogravimetria

Medidas simultâneas de DSC e TG foram obtidas para o AG livre, nanopartículas vazias e nanopartículas contendo AG. Enquanto as amostras foram aquecidas de maneira controlada, a DSC avaliou a energia em função da temperatura e a DTG determinou a estabilidade térmica por porcentagem de perda de massa em função da temperatura.

A curva do AG obtida por DSC (Figura 15) apresentou um pico endotérmico próximo de 100°C que corresponde à perda de água ($\Delta H = 294,3 \text{ J/g}$), indicando sua natureza cristalina.

O segundo pico entre 200 e 300°C corresponde a sua degradação ($\Delta H = 437,8$ J/g), onde a curva apresentou um percurso ascendente. A curva da DTG confirma que a perda de massa, em porcentagem, referente à perda de água (10,8%) e à decomposição (52,1%) ocorre na mesma faixa de temperatura que o evento apresentado na curva do DSC.

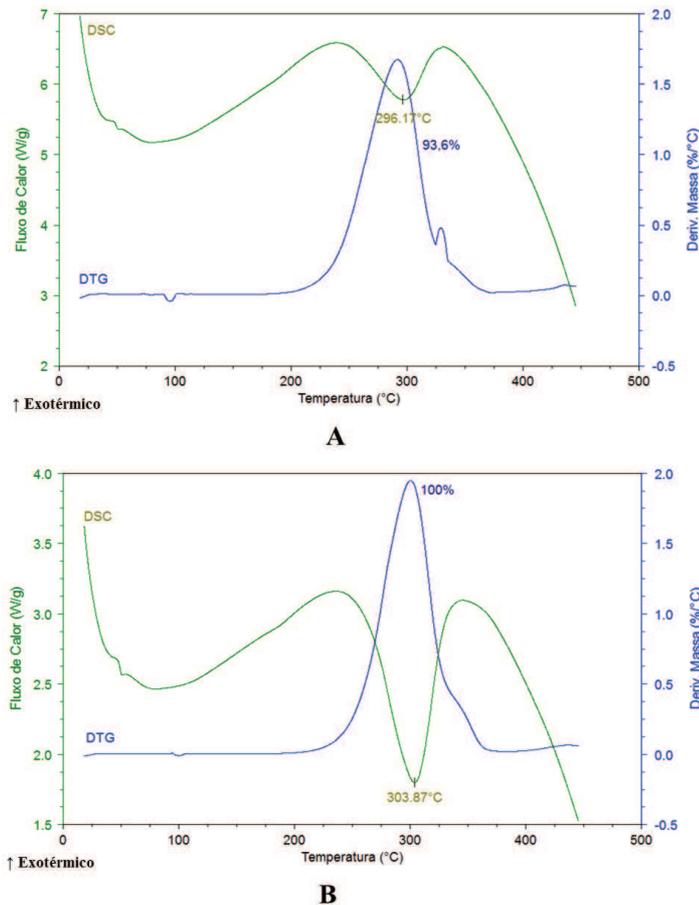
Figura 15 - Curvas de aquecimento obtidas por DSC e DTG para o AG.



O estado físico do AG encapsulado em nanopartículas de PLGA foi comparado com o fármaco livre e com as nanopartículas de PLGA. Na curva das nanopartículas de PLGA por DSC pode-se observar a presença de uma faixa endotérmica correspondente à degradação do polímero em 296,17°C ($\Delta H = 173,4$ J/g) (Figura 16A). Na formulação de nanopartículas de PLGA onde o AG foi encapsulado (Figura 16B), percebe-se somente uma faixa de decomposição em 303,87°C ($\Delta H = 287,4$ J/g), sendo essa temperatura mais alta que do AG puro (266,64°C), indicando um aumento da estabilidade térmica deste por meio do nanocarreador. Rosa *et al.* (2013) descreveram o mesmo perfil de proteção do fármaco pela matriz polimérica quando AG foi encapsulado em micropartículas de quitosana, ciclodextrina e xantana.

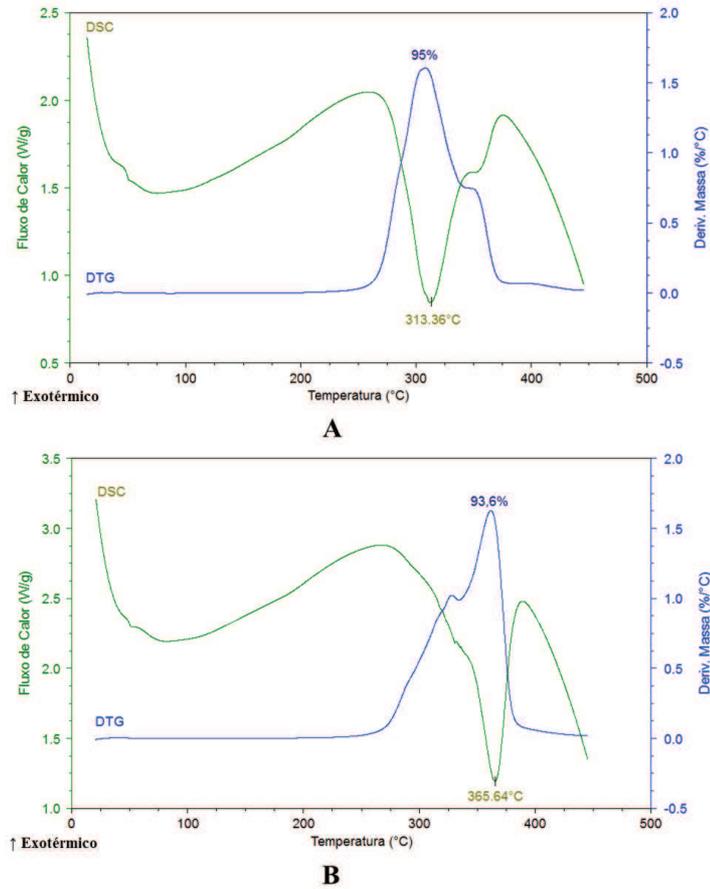
As curvas por DTG indicam uma perda de massa de 93,6% para a degradação das nanopartículas PLGA e de 100% para a degradação das nanopartículas de PLGA contendo AG, sendo que as temperaturas onde estas perdas ocorreram são as mesmas que foram encontradas nas curvas do DSC.

Figura 16 - Curvas de aquecimento obtidas por DSC e DTG para as nanopartículas de PLGA (A) e nanopartículas de PLGA contendo AG (B).



A curva obtida por DSC para as nanopartículas de PLGA/PS80 (Figura 17A) apresentou uma faixa de degradação em 313,36°C ($\Delta H = 300,7$ J/g), temperatura maior do que somente as nanopartículas de PLGA (296,17°C), confirmando a presença de PS80 na superfície das nanopartículas. Para a formulação de nanopartículas de PLGA/PS80 contendo AG (Figura 17B), o termograma indica um aumento maior da temperatura de degradação, para 365,64°C ($\Delta H = 213,5$ J/g). Comparando as temperaturas de degradação do AG puro (266,64°C) e das nanopartículas de PLGA contendo AG (303,87°C) com as nanopartículas de PLGA/PS80 contendo AG, pode-se sugerir que o PS80 é uma proteção adicional ao polímero, aumentando em maior proporção a estabilidade térmica do fármaco. Na curva de DTG, o início de degradação térmica das nanopartículas de PLGA/PS80 ocorre com uma perda de massa 95%, já para as nanopartículas de PLGA/PS80 contendo AG a perda de massa é de 93,6%, ambas acontecem nas mesmas temperaturas identificadas pela DSC.

Figura 17 - Curvas de aquecimento obtidas por DSC e DTG para as nanopartículas de PLGA/PS80 (A) e nanopartículas de PLGA/PS80 contendo AG (B).



As técnicas termo-analíticas, como DSC e TG são de grande utilidade para a análise de polímeros e para investigar interações entre os polímeros e os fármacos em formulações de nanopartículas (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Tanto para as nanopartículas de PLGA como para as nanopartículas revestidas com PS80 foi observado o desaparecimento dos eventos térmicos de fusão do AG, sugerindo que o fármaco se dispersou de forma molecular na matriz polimérica, alterando de sua forma cristalina para a forma amorfa. Estes dados corroboram com os resultados obtidos neste trabalho pela análise por DR-X. Além de que as formulações contendo AG se mostraram mais estáveis termicamente do que o fármaco livre.

6.3.7 Análise Morfológica

A avaliação das características da superfície e forma das nanopartículas de AG foi realizada por meio da técnica de MEV-FEG, sendo as fotomicrografias apresentadas nas Figuras 18 e 19.

Figura 18 - Aspectos morfológicos das nanopartículas de PLGA contendo AG (A) e das nanopartículas de PLGA contendo AG com medição na escala nanométrica (B). Aumento de 41,2 kx.

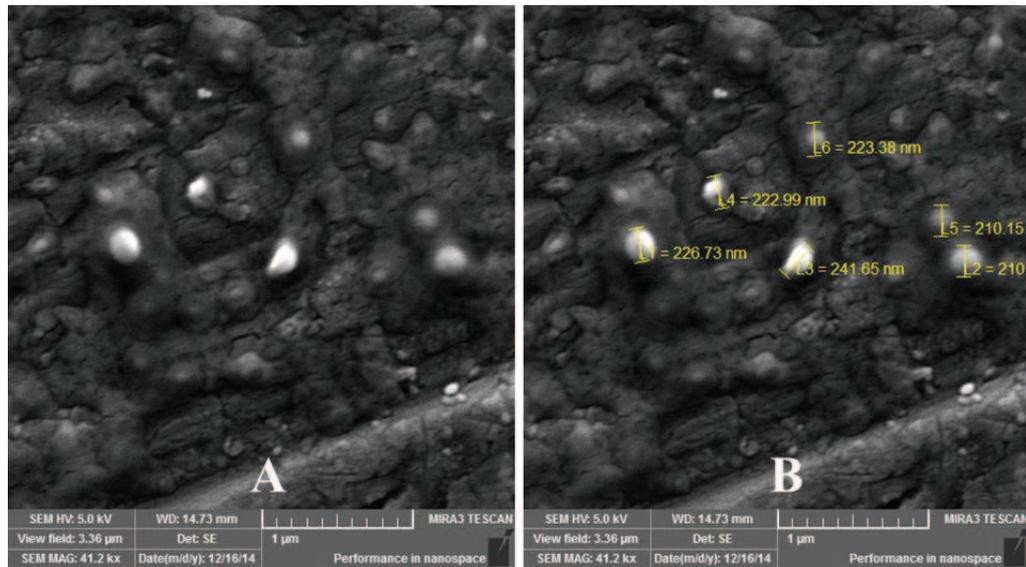
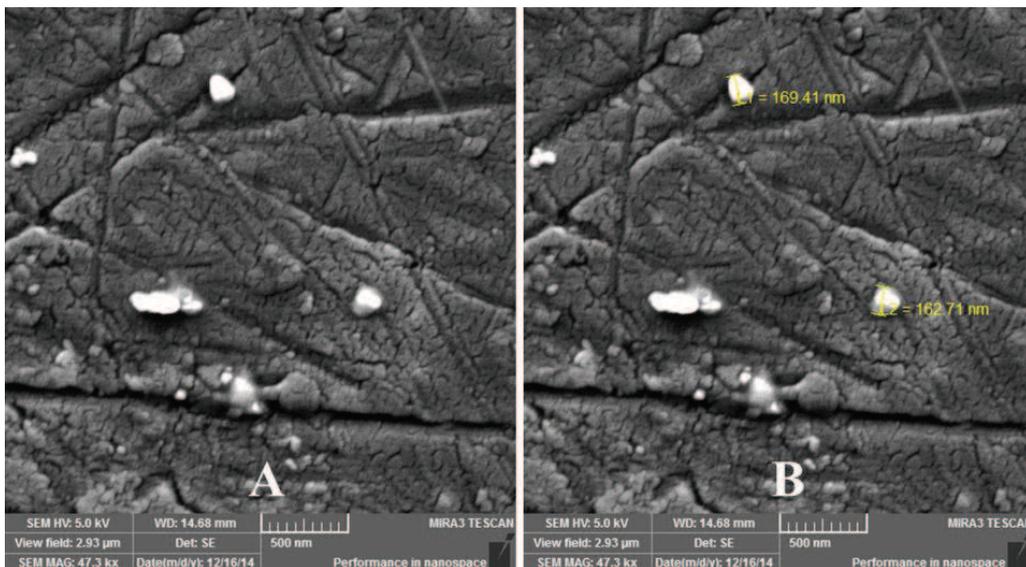


Figura 19 - Aspectos morfológicos das nanopartículas de PLGA/PS80 contendo AG (A) e das nanopartículas de PLGA/PS80 contendo AG com medição na escala nanométrica (B). Aumento de 47,3 kx.

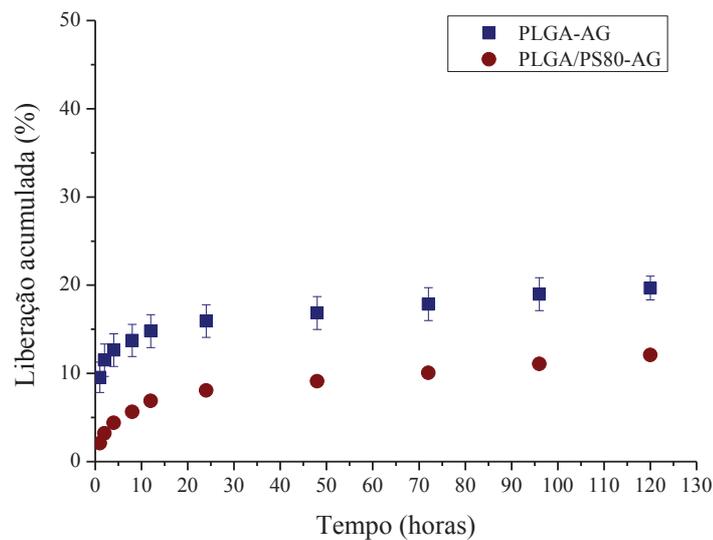


A análise morfológica confirmou a presença de um sistema nanoparticulado para as duas formulações em estudo. As nanopartículas de PLGA contendo AG se apresentaram com diâmetro próximo de 200 nm e com forma esférica bem definida e superfície lisa. As nanopartículas de PLGA/PS80 contendo AG se apresentaram com tamanho próximo de 160 nm e forma que tende à esférica. Os tamanhos ficaram próximos aos determinados pela técnica de DLS e condizentes com a técnica de obtenção emulsificação-evaporação do solvente que produz nanoesferas.

6.3.8 Estudo de Liberação *in vitro*

As nanopartículas de PLGA podem ser capazes de proporcionar a um fármaco uma liberação sustentada por poucas horas, dias ou semanas (WOHLFART, GELPERINA & KREUTER, 2012). Ambas as formulações de PLGA e PLGA/PS80 contendo AG apresentaram liberação lenta como pode ser observado na Figura 20.

Figura 20 - Perfil de liberação das nanopartículas de AG.



As nanopartículas de PLGA com AG apresentaram uma liberação acumulada de 19,67% em 72 h. As nanopartículas revestidas com PS80 apresentaram uma liberação acumulada de 12,08% no mesmo período. A possível explicação para essa diferença entre as duas formulações é a presença do PS80 na superfície das nanopartículas revestidas, o qual constitui um impedimento adicional à liberação do fármaco da matriz polimérica. Tal característica pode ser vantajosa para a aplicação pretendida de liberação cerebral, visto que o ideal é que uma maior porção do fármaco encapsulado seja liberada somente após atingir o SNC.

A partir dos perfis de liberação obtidos foi realizada a modelagem matemática dos dados. A modelagem matemática fornece conhecimento relativo ao transporte de massa e dos processos químicos envolvidos nos sistemas de liberação de fármacos, além dos parâmetros geométricos, utilizando uma abordagem sistemática com um número pequeno de análises experimentais (ARIFIN, LEE & WANG, 2006). A escolha do modelo ideal para cada formulação levou em consideração os valores do coeficiente de correlação (r), critério de

seleção do modelo (MSC) e constante de velocidade (k) que estão apresentados nas Tabelas 10 e 11. O modelo de segunda ordem apresenta duas constantes cinéticas do sistema, α e β .

Tabela 10 - Análise cinética da liberação de AG a partir de nanopartículas de PLGA.

	r	MSC	k (h⁻¹)
Ordem Zero	0,900	-2,344	0,220
Primeira Ordem	0,911	-2,288	0,002
Higuchi	0,901	-2,344	0,134
Segunda Ordem	0,996	4,189	$\alpha=0,0005$ / $\beta=0,232$

Tabela 11 - Análise cinética da liberação de AG a partir de nanopartículas de PLGA/PS80.

	r	MSC	k (h⁻¹)
Ordem Zero	0,914	-0,376	0,126
Primeira Ordem	0,919	-0,324	0,001
Higuchi	0,914	-0,376	0,076
Segunda Ordem	0,999	5,770	$\alpha=0,0004$ / $\beta=0,164$

A equação que apresentou melhor ajuste matemático aos perfis de liberação obtidos foi a do modelo de segunda ordem. A escolha do modelo levou em consideração o valor de r que fosse mais próximo de 1 e o maior valor obtido de MSC. Este modelo estabelece que o processo de liberação do fármaco a partir das nanopartículas ocorre em duas velocidades distintas (RITGER & PEPPAS, 1987). Para a formulação de PLGA, a fase onde a liberação foi mais rápida apresentou constante cinética de $0,0005 \text{ h}^{-1}$ e a fase lenta de $0,232 \text{ h}^{-1}$, enquanto para a formulação de PLGA com revestimento as constantes foram de $0,0004 \text{ h}^{-1}$ e $0,164 \text{ h}^{-1}$. A primeira etapa foi inicialmente rápida, também conhecida como efeito *burst*, provavelmente relacionada ao fármaco que estava aderido à superfície, e a segunda etapa mais lenta, de um modo mais controlado, relacionada ao fármaco presente na matriz polimérica. Sabe-se que nanopartículas desenvolvidas pelo método de emulsificação- evaporação do solvente apresenta uma liberação com efeito *burst* nas primeiras horas (JAVADZADEH *et al.*, 2010). Uma maior concentração inicial liberada de AG permite que sua concentração ideal no plasma seja atingida mais rapidamente, ao passo que uma liberação posterior mais lenta auxilia na manutenção dessa concentração por um período mais longo.

A aplicação do modelo de Korsmeyer-Peppas (ou lei das potências) permite verificar qual é o mecanismo pelo qual a substância é liberada das nanopartículas. O mecanismo de

liberação de um fármaco, baseado nas características físico-químicas do polímero, pode ser dividido em três processos principais, dentre eles a difusão, erosão ou a mistura de ambos os processos (ARIFIN, LEE & WANG, 2006). O valor do expoente de liberação (n) que indica o mecanismo de liberação está apresentado na Tabela 12.

Tabela 12 - Cálculo das constantes matemáticas pelo modelo de Korsmeyer-Peppas.

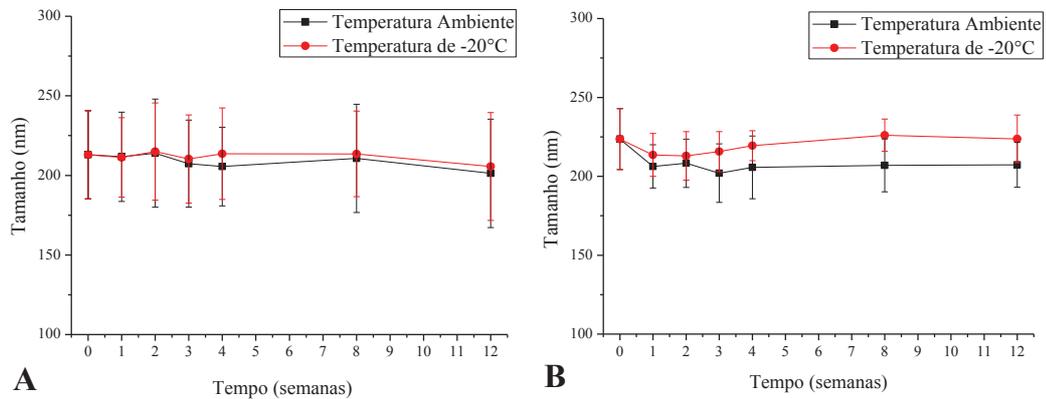
Formulação	n
Nanopartículas de PLGA contendo AG	0,13
Nanopartículas de PLGA/PS80 contendo AG	0,29

No caso de formas esféricas, a lei das potências apresenta duas interpretações físico-químicas distintas. Quando n assume um valor inferior a 0,43, indica que a liberação do fármaco é controlada pela difusão. Quando n é superior a 0,85, indica que a liberação é controlada pelo inchamento (ou erosão) do polímero e valores de n entre 0,43 e 0,85 estão relacionados com a junção de ambos os processos, denominado transporte anômalo (SIEPMANN & PEPPAS, 2001). Os valores de n e obtidos para as nanopartículas de PLGA e PLGA/PS80 foram 0,13 e 0,29, respectivamente. Portanto, pode-se observar que para as duas formulações de nanopartículas contendo AG, a liberação do fármaco ocorreu pelo mecanismo de difusão, também chamado de transporte Fickiano.

6.4 Estudo de Estabilidade das Nanopartículas frente ao Armazenamento

A análise do tamanho médio e índice de polidispersão de nanopartículas em função do tempo de armazenamento é uma forma simples de avaliar sua estabilidade. Em geral as nanopartículas poliméricas demonstram boa estabilidade (WOHLFART, GELPERINA & KREUTER, 2012). A análise do tamanho das formulações de nanopartículas de PLGA contendo AG e PLGA/PS80 contendo AG está representada na Figura 21.

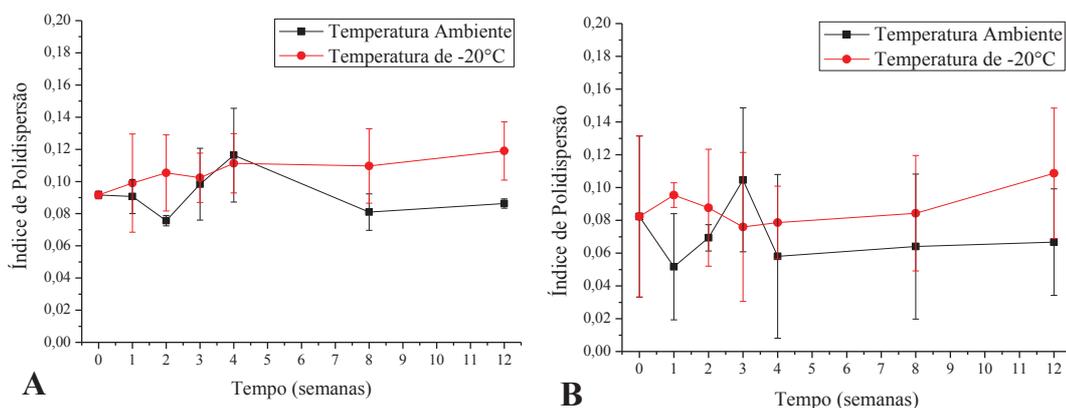
Figura 21 - Tamanho das nanopartículas de PLGA contendo AG (A) e nanopartículas de PLGA/PS80 contendo AG (B) (n=3).



Médias \pm desvio padrão (n=3) das leituras analisadas separadamente por temperatura (ANOVA com pós teste Tukey e α 0,05).

As nanopartículas de PLGA contendo AG se mantiveram estáveis durante as 12 semanas de armazenamento, tanto na temperatura ambiente como a -20°C . O mesmo ocorreu com as formulações revestidas com PS80. A análise do índice de polidispersão das formulações está representada na Figura 22.

Figura 22 - Índice de polidispersão das nanopartículas de PLGA contendo AG (A) e nanopartículas de PLGA/PS80 contendo AG (B) (n=3).



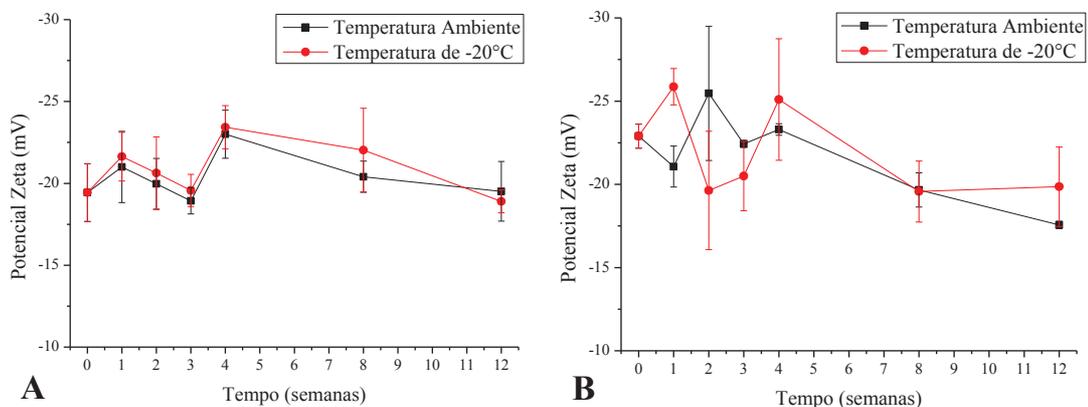
Médias \pm desvio padrão (n=3) das leituras analisadas separadamente por temperatura (ANOVA com pós teste Tukey e α 0,05).

As nanopartículas mantiveram o perfil monomodal inicial de distribuição de tamanho avaliado pelo índice de polidispersão. Inicialmente seu valor era de $0,092 \pm 0,002$ para as nanopartículas de PLGA contendo AG e $0,082 \pm 0,049$ para as nanopartículas de PLGA/PS80

contendo AG. Em todas as leituras realizadas durante as 12 semanas, os valores obtidos não diferiram significativamente entre si.

O potencial zeta é outro parâmetro importante a ser analisado na estabilidade, pode ser alterado com o passar do tempo caso ocorra mudanças na interface das nanopartículas com o meio dispersante. Isto pode acontecer em razão da dissociação de grupos funcionais na superfície das nanopartículas ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). A análise do potencial zeta para as nanopartículas contendo AG está representada na Figura 23.

Figura 23 - Potencial zeta das nanopartículas de PLGA contendo AG (A) e nanopartículas de PLGA/PS80 contendo AG (B), (n=3).



Médias \pm desvio padrão (n=3) das leituras analisadas separadamente por temperatura (ANOVA com pós teste Tukey e α 0,05).

As nanopartículas de PLGA apresentaram potencial zeta inicial de $-19,43 \pm 1,76$ mV que se manteve após o armazenamento em temperatura ambiente e à -20°C . As nanopartículas de PLGA/PS80 armazenadas em temperatura ambiente mantiveram o mesmo potencial somente até 8 semanas. A partir das 12 semanas o potencial que era de $22,90 \pm 0,72$ mV se alterou para $-17,56 \pm 0,22$ mV. Porém, quando armazenadas em temperatura de -20°C , os valores obtidos em todas as leituras não foram considerados diferentes do entre si, demonstrando sua estabilidade nesta condição de temperatura.

As suspensões coloidais, na maior parte das vezes, não tendem à separação de fases, entretanto, após o passar do tempo, pode ocorrer a aglomeração e a sedimentação das nanopartículas (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). O estudo de estabilidade físico-química se torna importante visto que a estabilidade de nanopartículas em meio aquoso pode ser limitada. Ambas as formulações não apresentaram tendência à floculação ou agregação devido aos resultados do tamanho médio e polidispersão. Entretanto, as nanopartículas de PLGA/PS80

tiveram seu potencial zeta alterado quando armazenadas mais que 8 semanas em temperatura ambiente. Como essas nanopartículas possuem a superfície modificada com um polissorbato que é solúvel em meio aquoso, pode ter ocorrido uma interação entre o PS80 e o meio dispersante nas condições apropriadas de temperatura, aumentando seu potencial. Por isso, o recomendado é seu armazenamento em temperatura de -20°C .

6.5 Caracterização Biológica das Nanopartículas

6.5.1 Avaliação da Toxicidade Celular sobre Hemácias - Ensaio *ex vivo*

Na avaliação da toxicidade celular sobre hemácias, o AG livre e as nanopartículas de PLGA contendo AG não apresentaram atividade hemolítica em todas as concentrações testadas (80, 40 e 20 $\mu\text{g/mL}$) após 72 h de incubação. O AG nas mesmas concentrações apresentou uma instabilidade em relação as suas propriedades físicas, de uma coloração transparente se tornou verde-acinzentado após 24 h de incubação (Figura 24). Fato este não observado com as nanopartículas que continham o mesmo composto, sugerindo uma possível proteção para o fármaco neste sistema de liberação.

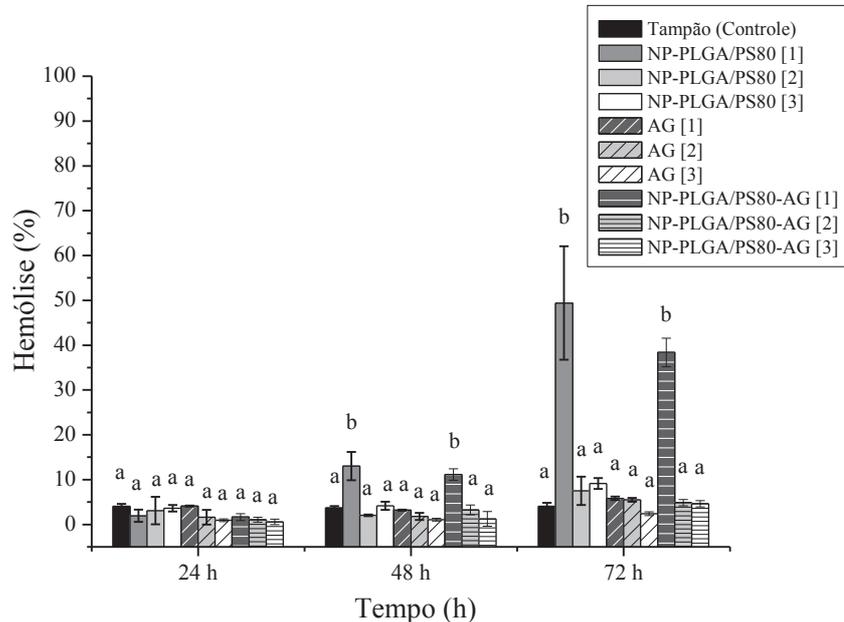
Figura 24 - Poços de uma microplaca de Elisa utilizada para a leitura dos sobrenadantes resultantes da centrifugação da suspensão de hemácias.



(A) tratamento das hemácias com água representando 100% de hemólise, (B) nanopartículas de PLGA contendo AG na concentração de 80 $\mu\text{g/mL}$ demonstrando ausência de hemólise e (C) AG livre na concentração de 80 $\mu\text{g/mL}$ representando a alteração nas propriedades do fármaco em tampão com ausência de hemólise.

As propriedades da superfície das nanopartículas podem danificar diretamente as membranas de hemácias (NAAHIDI *et al.*, 2013). O PS80 pode atuar como um tensoativo em formulações e conseqüentemente um potencial hemolítico é esperado das formulações de nanopartículas revestidas com este tipo de polissorbato. Na Figura 25 estão apresentados os valores obtidos da porcentagem de hemólise das nanopartículas vazias de PLGA/PS80, AG livre e nanopartículas de PLGA/PS80 contendo AG nas concentrações de 80, 40 e 20 $\mu\text{g/mL}$ após 24, 48 e 72 h de incubação.

Figura 25 - Porcentagem de hemólise das nanopartículas de PLGA/PS80, AG e nanopartículas de PLGA/PS80 contendo AG.



[1] refere-se à concentração de AG de 80 $\mu\text{g/mL}$, [2] de 40 $\mu\text{g/mL}$ e [3] de 20 $\mu\text{g/mL}$.

a, b, c médias de triplicada \pm desvio padrão analisadas a cada 24 h, onde letras iguais significam igualdade estatística e letras diferentes desigualdade estatísticas (ANOVA com pós teste Tukey e α 0,05).

É possível observar que as nanopartículas de PLGA/PS80 com concentração de 80 $\mu\text{g/mL}$ de AG, causaram hemólise significativa após 72 h e baixa hemólise em 48 h. O mesmo ocorreu com as nanopartículas vazias de PLGA revestidas. Fato este que pode ter ocorrido pelo aumento de PS80 aderido à superfície das nanopartículas ser proporcional à concentração de AG. Nas concentrações de 40 e 20 $\mu\text{g/mL}$, a porcentagem de hemólise ficou abaixo de 10% em todos os tempos, semelhante ao controle. Mudanças nas características físicas do AG também não foram observadas neste sistema de liberação.

A verificação do caráter hemolítico das nanopartículas é uma parte importante dos estudos pré-clínicos de formulações, pois estas caso sejam administradas intravenosamente entrariam em contato primeiramente com as células vermelhas do sangue que existem em uma porção maior na corrente sanguínea do que as células fagocíticas mononucleares. Por esta razão, o exame pré-clínico da biocompatibilidade com componentes celulares deve ser considerado (NAAHIDI *et al.*, 2013). Portanto, ambas as formulações de nanopartículas poliméricas contendo AG se mostraram compatíveis com as hemácias nas concentrações de 40 e 20 $\mu\text{g/mL}$, sendo que as formulações que possuem revestimento com PS80 possuem uma tendência a causar danos à membrana caso a concentração de AG seja mais alta, pois

consequentemente a quantidade de PS80 também aumenta. As nanopartículas sem revestimento demonstraram ausência de toxicidade em todas as concentrações analisadas.

6.5.2 Determinação da Atividade Antioxidante *in vitro*

Os radicais livres são átomos, moléculas ou íons com elétrons desemparelhados que fazem parte de processos fisiológicos essenciais para o corpo humano. Estes radicais são altamente instáveis e atuam em algumas reações químicas com outras moléculas, sendo derivados de três elementos, oxigênio, nitrogênio ou enxofre, criando assim as espécies reativas de oxigênio (ERO's), espécies reativas de nitrogênio (ERN's) e espécies reativas de enxofre (ERE's) (CAROCHO & FERREIRA, 2013). Em excesso, os radicais livres podem ter efeito negativo no organismo humano, como por exemplo, as ERO's podem causar dano em componentes moleculares por meio da oxidação de lipídeos, proteínas e DNA (NAGPAL, SINGH & MISHRA, 2013; STEVANOVIC *et al.*, 2014).

Os radicais livres desempenham um importante papel na patologia das doenças neurodegenerativas, portanto, os antioxidantes podem servir como um agente complementar na terapia de tais doenças (JI, ZHANG & SHEN, 2006). O AG tem a habilidade remover as ERO's verificada em muitos estudos, além de que foi identificado como um eficiente sequestrador dos radicais ABTS e 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) (ABDELWAHED *et al.*, 2007; PAL *et al.*, 2010; YU *et al.*, 2011).

O ABTS é um dos métodos colorimétricos mais utilizados para avaliar a atividade antioxidante de compostos. O ABTS pode ser oxidado, gerando o radical ABTS•+, que pode ser medido por espectrofotometria em 414, 660 ou 734 nm (JIA *et al.*, 2012). Portanto, a propriedade antioxidante do AG livre e das nanopartículas contendo AG foi analisada por este método colorimétrico. Os resultados estão apresentados na Tabela 13 e foram expressos como porcentagem de inibição.

Tabela 13 - Porcentagem de inibição do radical ABTS•+ das nanopartículas de PLGA e PLGA/PS80 contendo AG nas concentrações de 15,62; 7,81 e 3,90 µg/mL nos tempos de 0, 2, 4, 8, 24 e 48 h.

Concentração Final de AG	Porcentagem de Inibição		
	Nanopartículas de PLGA-AG	Nanopartículas de PLGA/PS80-AG	AG livre
0 h			
15,62 µg/mL	85,44 ± 3,80 ^b	46,42 ± 7,18 ^c	99,83 ± 0,29 ^a
7,81 µg/mL	66,62 ± 11,19 ^b	25,26 ± 6,56 ^c	99,87 ± 0,00 ^a
3,90 µg/mL	37,47 ± 5,14 ^b	15,60 ± 5,62 ^c	99,37 ± 0,25 ^a
2 h			
15,62 µg/mL	96,00 ± 4,78 ^a	49,35 ± 10,14 ^b	98,93 ± 0,46 ^a
7,81 µg/mL	73,82 ± 10,76 ^b	30,67 ± 1,45 ^c	99,16 ± 0,07 ^a
3,90 µg/mL	49,58 ± 10,79 ^b	18,22 ± 4,79 ^c	99,08 ± 0,52 ^a
4 h			
15,62 µg/mL	97,67 ± 4,03 ^a	54,09 ± 6,42 ^b	99,48 ± 0,14 ^a
7,81 µg/mL	80,96 ± 9,36 ^b	30,48 ± 2,28 ^c	99,64 ± 0,00 ^a
3,90 µg/mL	45,60 ± 6,82 ^b	17,11 ± 0,92 ^c	99,48 ± 0,49 ^a
8 h			
15,62 µg/mL	94,07 ± 8,10 ^a	42,45 ± 6,74 ^b	99,48 ± 0,14 ^a
7,81 µg/mL	64,46 ± 11,96 ^b	24,29 ± 2,44 ^c	99,64 ± 0,00 ^a
3,90 µg/mL	39,53 ± 3,93 ^b	15,48 ± 1,08 ^c	99,48 ± 0,49 ^a
24 h			
15,62 µg/mL	87,27 ± 7,57 ^a	38,13 ± 3,52 ^b	99,12 ± 0,30 ^a
7,81 µg/mL	51,74 ± 8,65 ^b	22,64 ± 4,12 ^c	94,47 ± 0,62 ^a
3,90 µg/mL	30,77 ± 6,31 ^b	15,44 ± 1,18 ^c	92,07 ± 0,79 ^a
48 h			
15,62 µg/mL	83,37 ± 6,34 ^b	30,94 ± 4,41 ^c	99,50 ± 0,12 ^a
7,81 µg/mL	39,89 ± 8,45 ^b	16,04 ± 1,36 ^c	93,56 ± 0,45 ^a
3,90 µg/mL	24,67 ± 3,71 ^b	13,03 ± 1,68 ^c	69,01 ± 2,01 ^a

^{a, b, c} médias ± desvio padrão (n=3) analisadas por linha, onde letras iguais significam igualdade estatística e letras diferentes desigualdade estatísticas (ANOVA com pós teste Tukey e α 0,05).

A análise dos resultados apresenta uma pronunciada atividade antioxidante do AG livre, demonstrando a tendência de decaimento de sua atividade depois de 48 h na

concentração de 3,90 µg/mL. Isso ocorre devido à característica do AG de se oxidar de modo não enzimático em soluções fisiológicas, gerando seus metabólitos que possuem atividade antioxidante menor (GIL-LONGO & GONZÁLEZ-VÁZQUEZ, 2010). No estudo de Mansouri *et al.* (2013b) a dose necessária para alcançar resultados positivos *in vivo* foi de 10 mg/kg, visto que nas concentrações mais baixas o AG não produziu efeito, demonstrando seu rápido metabolismo.

As nanopartículas de PLGA demonstraram ter um perfil de sistemas de liberação controlada, pois houve um aumento da inibição no tempo inicial de 85,44 a 97,67% após 4 h. Após esse período, houve um decaimento da inibição do AG presente nas nanopartículas, devido à restrição do método de avaliar a atividade de compostos que se metabolizam rapidamente em tampões. Depois de certo período de tempo, o AG incubado em um sistema estático, como é o sistema *in vitro*, se oxida e quando uma alíquota deste é retirada para a realização do teste, o composto liberado das nanopartículas tem parcialmente se oxidado, causando a diminuição da inibição do radical.

As nanopartículas de PLGA/PS80 demonstraram uma menor atividade antioxidante. Este resultado é condizente com aqueles encontrados no teste de liberação *in vitro*, onde esta formulação apresentou uma menor porcentagem de liberação acumulada que pode estar relacionada à menor atividade. Sabe-se que o PS80 é uma proteção adicional ao fármaco e por isso, é utilizado para o direcionamento cerebral. Diante disso, pode-se sugerir que o AG encapsulado em nanopartículas com revestimento enfrenta uma barreira adicional para ser liberado no meio fisiológico, possuindo uma liberação mais controlada e direcionada que as nanopartículas com somente PLGA.

A atividade das nanopartículas *in vivo* pode ser totalmente diferente, pois estão relacionados mecanismos que conseguem direcioná-las a um local específico, protegem o fármaco de sua degradação, aumentam a biodisponibilidade, dentre outros, que provavelmente melhorem a atividade antioxidante encontrada *in vitro*. Além disso, a maior parte das formulações na literatura que encapsularam o AG utilizaram materiais como sílica, quitosana, ciclodextrina, xantana, tetróxido de triferro, selênio, magnetita e ouro (MORENO-ÁLVAREZ *et al.*, 2010; BARNABY *et al.*, 2011; DELIGIANNAKIS, SOTIRIOU & PRATSINIS, 2012; DORNIANI *et al.*, 2012; NAGPAL, SINGH & MISHRA, 2013; ROSA *et al.*, 2013; DORNIANI *et al.*, 2014). Estes materiais apresentam menor biocompatibilidade e biodegradabilidade que o PLGA utilizado neste estudo, que é um polímero ideal para o encapsulamento de fármacos em nanopartículas. De modo geral, as características físico-

químicas e biológicas apresentadas pelas nanopartículas deste estudo foram favoráveis, indicando que as nanopartículas de PLGA e PLGA/PS80 são potenciais carreadores de AG.

7 CONCLUSÕES

Um método analítico por CLAE com detecção por PDA foi desenvolvido com sucesso, sendo obtidos parâmetros padronizados, tais como especificidade, linearidade, intervalo, precisão, limite de detecção e quantificação, exatidão e robustez, ideais para a quantificação de AG no sobrenadante das nanopartículas e na solução do teste de liberação *in vitro*.

As nanopartículas obtidas de PLGA e PLGA/PS80 contendo AG foram produzidas pelo método de emulsificação-evaporação do solvente com emulsão simples. As formulações apresentaram características físico-químicas como tamanho médio, índice de polidispersão, distribuição de tamanho, potencial de superfície, estabilidade térmica, forma e cinética de liberação, adequadas para um sistema de liberação de fármacos. Além de que o fármaco encapsulado apresentou caráter amorfo que é favorável aos sistemas carreadores.

As nanopartículas de PLGA contendo AG demonstraram estabilidade frente às duas formas de armazenamento, em temperatura ambiente e refrigeração de -20°C. Da mesma forma, as nanopartículas de PLGA/PS80 contendo AG mantiveram a estabilidade levando em consideração a análise do tamanho e índice de polidispersão. Porém, em relação ao potencial zeta, a temperatura ambiente influenciou na sua estabilidade, sendo então recomendado o armazenamento dessa formulação em refrigeração de -20°C.

As nanopartículas desenvolvidas não apresentaram toxicidade celular sobre hemácias significativa nas concentrações de 40 e 20 µg/mL de AG e demonstraram potencial antioxidante com liberação controlada e dependente da concentração.

Os resultados indicam que as nanopartículas produzidas possuem características físico-químicas e biológicas adequadas para o carreamento de AG. Para confirmar o possível efeito antioxidante e neuroprotetor do AG presente nas formulações devido ao seu direcionamento cerebral, é necessário a realização de experimentos *in vivo*.

8 REFERÊNCIAS

- ABDELWAHED, A.; BOUHLEL, I.; SKANDRANI, I.; VALENTI, K.; KADRI, M.; GUIRAUD, P.; STEIMAN, R.; MARIOTTE, A.-M.; GHEDIRA, K.; LAPORTE, F.; DIJOUX-FRANCA, M.-G.; CHEKIR-GHEDIRA, L. Study of antimutagenic and antioxidant activities of gallic acid and 1,2,3,4,6-pentagalloylglucose from *Pistacia lentiscus* - Confirmation by microarray expression profiling. **Chemico-Biological Interactions**, v.165, n.1, p.1-13, 2007.
- ACHARYA, S.; SAHOO, S.K. PLGA nanoparticles containing various anticancer agents and tumour delivery by EPR effect. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.63, n.3, p.170-183, 2011.
- AJETUNMOBI, A.; PRINA-MELLO, A.; VOLKOV, Y.; CORVIN, A.; TROPEA, D. Nanotechnologies for the study of the central nervous system. **Progress in Neurobiology**, v.123, p.18-36, 2014.
- ALAM, M.I.; BEG, S.; SAMAD, A.; BABOOTA, S.; KOHLIA, K.; ALI, J.; AHUJA, A.; AKBARD, M. Strategy for effective brain drug delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.40, n.5, p.385-403, 2010.
- ALEXIS, F.; RHEE, J.-W.; RICHIE, J.P.; RADOVIC-MORENO, A.F.; LANGER, R.; FAROKHZAD, O.C. New frontiers in nanotechnology for cancer treatment. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, v.26, n.1, p.74-85, 2008.
- ALSHAMSAN, A. Nanoprecipitation is more efficient than emulsion solvent evaporation method to encapsulate cucurbitacin I in PLGA nanoparticles. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v.22, n.3, p.219-222, 2014.
- ARIFIN, D.Y.; LEE, L.Y.; WANG, C.-H. Mathematical modeling and simulation of drug release from microspheres: Implications to drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.58, n.12-13, p.1274-1325, 2006.
- BAN, J.Y.; NGUYEN, H.T.T.; LEE, H.-J.; CHO, S.O.; JU, H.S.; KIM, J.Y.; BAE, K.; SONG, K.-S.; SEONG, Y.H. Neuroprotective properties of gallic acid from *Sanguisorbae* radix on amyloid β protein (25—35)-induced toxicity in cultured rat cortical neurons. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.31, n.1, p.149-153, 2008.
- BANYAL, S.; MALIK, P.; TULI, H.S.; MUKHERJEE, T.K. Advances in nanotechnology for diagnosis and treatment of tuberculosis. **Current Opinion in Pulmonary Medicine**, v.19, n.3, p.289-297, 2013.

BARNABY, S.; SARKER, N.; DOWDELL, A.; BANERJEE, I. The spontaneous formation of selenium nanoparticles on gallic acid assemblies and their antioxidant properties. **The Fordham Undergraduate Research Journal**, v.1, p.41-46, 2011.

BEDÊ, P.M. **Produção e caracterização de nanopartículas polimérico-magnéticas para aplicações biomédicas**. 2010. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Materiais) - Instituto Militar de Engenharia, Rio de Janeiro, 2010.

BERGAMINI, G. **Dexametasona: interação com ácidos carboxílicos aromáticos no estado sólido**. 2008. 157 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

BHADORIYA, U.; SHARMA, P.; SOLANKI, S.S. *In vitro* free radical scavenging activity of gallic acid isolated from *Caesalpinia Decapetala* Wood. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v.2, n.2, p.833-836, 2012.

BHATTACHARYYA, S.; AHAMMED, S.M.; SAHA, B.P.; MUKHERJEE, P.K. The gallic acid-phospholipid complex improved the antioxidant potential of gallic acid by enhancing its bioavailability. **AAPS Pharmaceutical Science Technology**, v.14, n.3, p.1025-1033, 2013.

BICKER, J.; ALVES, G.; FORTUNA, A.; FALCÃO, A. Blood-brain barrier models and their relevance for a successful development of CNS drug delivery systems: A review. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.87, n.3, p.409-432, 2014.

BIDDLESTONE-THORPE, L.; MARCHI, N.; GUO, K.; GHOSH, C.; JANIGRO, D.; VALERIE, K.; YANG, H. Nanomaterial-mediated CNS delivery of diagnostic and therapeutic agent. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.64, n.7, p.605-613, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Anexo da Resolução - RE nº. 899 de 29 de maio de 2003 - Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos.

BUDHIAN, A.; SIEGEL, S.J.; WINEY, K.I. Haloperidol-loaded PLGA nanoparticles: Systematic study of particle size and drug content. **International Journal of Pharmaceutics**, v.336, n.2, p.367-375, 2007.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I.C.F.R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, v.51, p.15-25, 2013.

CHANWITHEESUK, A.; TEERAWUTGULRAG, A.; KILBURN, J.D.; RAKARIYATHAM, N. Antimicrobial gallic acid from *Caesalpinia mimosoides* Lamk. **Food Chemistry**, v.100, n.3, p.1044-1048, 2007.

CHATTERJEE, A.; CHATTERJEE, S.; BISWAS, A.; BHATTACHARYA, S.; CHATTOPADHYAY, S.; BANDYOPADHYAY, S.K. Gallic acid enriched fraction of *Phyllanthus emblica* potentiates indomethacin-induced gastric ulcer healing via e-NOS-dependent pathway. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.2012, p.1-13, 2012.

CHEN, Y.-J.; CHANG, L.-S. Gallic acid downregulates matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9 in human leukemia cells with expressed Bcr/Abl. **Molecular Nutrition & Food Research**, v.56, n.9, p.1398-1412, 2012.

CHENG, Y.; MORSHED, R.A.; AUFFINGER, B.; TOBIAS, A.T.; LESNIAK, M.S. Multifunctional nanoparticles for brain tumor imaging and therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.66, p.42-57, 2014.

CHEREDDY, K.K.; HER, C.-H.; COMUNE, M.; MOIA, C.; LOPES, A.; PORPORATO, P.E.; VANACKER, J.; LAME, M.C.; STEINSTRASSER, L.; SONVEAUX, P.; ZHUC, H.; FERREIRA, L.S.; VANDERMEULEN, G.; PRÉAT, V. PLGA nanoparticles loaded with host defense peptide LL37 promote wound healing. **Journal of Controlled Release**, v.194, p.138-147, 2014.

CHO, Y.-S.; KIM, S.-K.; AHN, C.-B.; JE, J.-Y. Preparation, characterization, and antioxidant properties of gallic acid-grafted-chitosans. **Carbohydrate Polymers**, v.83, n.4, p.1617-1622, 2011.

CIRILLO, G.; KRAEMER, K.; FUESSEL, S.; PUOCI, F.; CURCIO, M.; SPIZZIRRI, U.G.; ALTIMARI, I.; IEMMA, F. Biological activity of a gallic acid-gelatin conjugate. **Biomacromolecules**, v.11, n.12, p.3309-3315, 2010.

COHEN-SELA, E.; CHORNY, M.; KOROUKHOV, N.; DANENBERG, H.D.; GOLOMB, G. A new double emulsion solvent diffusion technique for encapsulating hydrophilic molecules in PLGA nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v.133, n.3, p.90-95, 2009.

COURANT, T.; ROULLIN, V.G.; CADIOU, C.; DELAVOIE, F.; MOLINARI, M.; ANDRY, M.C.; CHUBURU, F. Development and physicochemical characterization of copper complexes-loaded PLGA nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v.379, n.2, p.226-234, 2009.

CUPAIOLI, F.A.; ZUCCA, F.A.; BORASCHI, D.; ZECCA, L. Engineered nanoparticles. How brain friendly is this new guest? **Progress in Neurobiology**, v.119-120, p.20-38, 2014.

DANESHFAR, A.; HASSAN, S.G.; HOMAYOUN, N. Solubility of gallic acid in methanol, ethanol, water, and ethyl acetate. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v.53, p.776-778, 2008.

DE MEJÍA, E.G.; CHANDRA, S.; RAMÍREZ-MARES, M.V.; WANG, W. Catalytic inhibition of human DNA topoisomerase by phenolic compounds in *Ardisia compressa* extracts and their effect on human colon cancer cells. **Food and Chemical Toxicology**, v.44, n.8, p.1191-1203, 2006.

DEL RIO, D.; CALANI, L.; SCAZZINA, F.; JECHIU, L.; CORDERO, C.; BRIGHENTI, F. Bioavailability of catechins from ready-to-drink tea. **Nutrition**, v.26, n.5, p.528-533, 2010.

DELIE, F.; BLANCO-PRÍETO, M.J. Polymeric particulates to improve oral bioavailability of peptide drugs. **Molecules**, v.10, n.1, p.65-80, 2005.

DELIGIANNAKIS, Y.; SOTIRIOU, G.A.; PRATSINIS, S.E. Antioxidant and antiradical SiO₂ nanoparticles covalently functionalized with gallic acid. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v.4, n.12, p.6609-6617, 2012.

DESHMUKH, H.; PRABHU, P.J. Development of RP-HPLC method for qualitative analysis of active ingredient (gallic acid) from stem bark of *Dendrophthoe falcate* Linn. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research**, v.3, n.2, p.146-149, 2011.

DHINGRA, D.; CHHILLAR, R.; GUPTA, A. Antianxiety-like activity of gallic acid in unstressed and stressed mice: possible involvement of nitriergic system. **Neurochemical Research**, v.37, n.3, p.487-494, 2012.

DÍEZ; M.T.; MORAL, P.G.; RESINES, J.A.; ARÍN, M.J. Determination of phenolic compounds derived from hydrolysable tannins in biological matrices by RPHPLC. **Journal of Separation Science**, v.31, n.15, p.2797-2803, 2008.

DORNIANI, D.; HUSSEIN, M.Z.B.; KURA, A.U.; FAKURAZI, S.; SHAARI, A.H.; AHMAD, Z. Preparation of Fe₃O₄ magnetic nanoparticles coated with gallic acid for drug delivery. **International Journal of Nanomedicine**, v.7, p.5745-5756, 2012.

DORNIANI, D.; KURA, A.U.; HUSSEIN-AL-ALI, S.H.; HUSSEIN, M.Z.B.; FAKURAZI, S.; SHAARI, A.H.; AHMAD, Z. *In vitro* sustained release study of gallic acid coated with

magnetite-PEG and magnetite-PVA for drug delivery system. **Scientific World Journal**, v.2014, p.1-11, 2014.

EGUSQUIAGUIRRE, S.P.; IGARTUA, M.; HERNÁNDEZ, R.M.; PEDRAZ, J.L. Nanoparticle delivery systems for cancer therapy: advances in clinical and preclinical research. **Clinical and Translational Oncology**, v.14, n.2, p.83-93, 2012.

ERDÓCIA, F.A.B. **Difração de raios X em minerais de bauxita e análise através de refinamento pelo método de Rietveld**. 2011. 93 f. Dissertação (Mestrado em Física na área de Física da Matéria Condensada) - Universidade Federal do Pará, Belém, 2011.

EZHILARASI, P.N.; KARTHIK, P.; CHHANWAL, N.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Nanoencapsulation techniques for food bioactive components: A review. **Food and Bioprocess Technology**, v.6, n.3, p.628-647, 2013.

FARAJI, A.H.; WIPF, P. Nanoparticles in cellular drug delivery. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.17, n.8, p.2950-2962, 2009.

FERREIRA, A.J.; CEMLYN-JONES, J.; CORDEIRO, C.R. Nanoparticles, nanotechnology and pulmonary nanotoxicology. **Revista Portuguesa de Pneumologia**, v.19, n.1, p.28-37, 2013.

FERRUZZI, M.G.; LOBO, J.K.; JANLE, E.M.; COOPER, B.; SIMON, J.E.; WU, Q.-L.; WELCH, C.; HO, L.; WEAVER, C.; PASINETTI, G.M. Bioavailability of gallic acid and catechins from grape seed polyphenol extract is improved by repeated dosing in rats: implications for treatment in Alzheimer's disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v.18, n.1, p.113-124, 2009.

FEYNMAN, R. There's plenty of room at the bottom (reprint from speech given at annual meeting of the American Physical Society). **Engineering Science**, v.23, p.22-36, 1960.

FONSECA, C.; SIMÕES, S.; GASPAR, R. Paclitaxel-loaded PLGA nanoparticles: Preparation, physicochemical characterization and *in vitro* anti-tumoral activity. **Journal of Controlled Release**, v.83, n.2, p.273-286, 2002.

GIL-LONGO, J.; GONZÁLEZ-VÁZQUEZ, C. Vascular pro-oxidant effects secondary to the autoxidation of gallic acid in rat aorta. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.21, n.4, p.304-309, 2010.

HABTEMARIAM, S. Methyl-3-O-methyl gallate and gallic acid from the leaves of *Peltiphyllum peltatum*: isolation and comparative antioxidant, prooxidant, and cytotoxic effects in neuronal cells. **Journal of Medicinal Food**, v.14, n.11, p.1412-1418, 2011.

HE, C.; HU, Y.; YIN, L.; TANG, C.; YIN, C. Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles. **Biomaterials**, v.31, n.13, p.3657-3666, 2010.

HO, H.-H.; CHANG, C.-S.; HO, W.-C.; LIAO, S.-Y.; LIN, W.-L.; WANG, C.-J. Gallic acid inhibits gastric cancer cells metastasis and invasive growth via increased expression of RhoB, downregulation of AKT/small GTPase signals and inhibition of NF-Kb activity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.266, n.1, p.76-85, 2013.

HSIANG, C.-Y.; HSEU, Y.-C.; CHANG, Y.-C.; KUMAR, K.J.S.; HO, T.-Y.; YANG, H.-L. *Toona sinensis* and its major bioactive compound gallic acid inhibit LPS-induced inflammation in nuclear factor-Kb transgenic mice as evaluated by *in vivo* bioluminescence imaging. **Food Chemistry**, v.136, p.426-434, 2013.

HSU, J.-D.; KAO, S.-H.; OU, T.-T.; CHEN, Y.-J.; LI, Y.-J.; WANG, C.-J. Gallic Acid induces G2/M phase arrest of breast cancer cell MCF-7 through stabilization of p27Kip1 attributed to disruption of p27Kip1/Skp2 complex. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.59, n.5, p.1996-2003, 2011.

HUANG, P.-J.; HSEU, Y.-C.; LEE, M.-S.; KUMAR, K.J.S.; WUC, C.-R.; HSU, L.-S.; LIAO, J.-W.; CHENG, I.-S.; KUO, Y.-T.; HUANG, S.-Y.; YANG, H.-L. *In vitro* and *in vivo* activity of gallic acid and *Toona sinensis* leaf extracts against HL-60 human premyelocytic leukemia. **Food and Chemical Toxicology**, v.50, n.10, p.3489-3497, 2012.

HUGHES, G.A. Nanostructure-mediated drug delivery. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v.1, n.1, p.22-30, 2005.

HWANG, E.Y.; HUH, J.-W.; CHOI, M.-M.; CHOI, S.Y.; HONG, H.-N.; CHO, S.-W. Inhibitory effects of gallic acid and quercetin on UDP-glucose dehydrogenase activity. **FEBS Letters**, v.582, n.27, p.3793-3797, 2008.

ICH topic Q2(R1): "Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology". European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, London, 2005.

IURCKEVICZ, G. **Utilização de amido reticulado como matriz para imobilização do fármaco diclofenaco de sódio**. 2014. 73 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de

Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2014.

JAIN, S.K.; RAINS, J.; JONES, K. Effect of curcumin on protein glycosylation, lipid peroxidation, and oxygen radical generation in human red blood cells exposed to high glucose levels. **Free Radical Biology & Medicine**, v.41, n.1, p.92-96, 2006.

JAVADZADEH, Y.; AHADI, F.; DAVARAN, S.; MOHAMMADI, G.; SABZEVARI, A.; ADIBKIA, K. Preparation and physicochemical characterization of naproxen-PLGA nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.81, n.2, p.498-502, 2010.

JI, H.F.; ZHANG, H.-Y.; SHEN, L. Proton dissociation is important to understanding structure-activity relationships of gallic acid antioxidants. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.16, n.15, p.4095-4098, 2006.

JIA, S.-M.; LIU, X.-F.; KONG, D.-M.; SHEN, H.-X. A simple, post-additional antioxidant capacity assay using adenosine triphosphate-stabilized 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid (ABTS) radical cation in a G-quadruplex DNzyme catalyzed ABTS-H₂O₂ system. **Biosensors and Bioelectronics**, v.35, n.1, p.407-412, 2012.

JOSE, S.; SOWMYA, S.; CINU, T.A.; ALEYKUTTY, N.A.; THOMAS, S.; SOUTO, E.B. Surface modified PLGA nanoparticles for brain targeting of Bacoside-A. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.63, p.29-35, 2014.

KABANOV, A.V.; GENDELMAN, H.E. Nanomedicine in the diagnosis and therapy of neurodegenerative disorders. **Progress in Polymer Science**, v.32, n.8-19, 1054-1082, 2007.

KANBAK, G.; CANBEK, M.; OĞLAKÇI, A.; KARTKAYA, K.; SENTÜRK, H.; BAYRAMOĞLU, G.; BAL, C.; GÖL, B.; ÖZMEN, A. Preventive role of gallic acid on alcohol dependent and cysteine protease-mediated pancreas injury. **Molecular Biology Reports**, v.39, n.12, p.10249-10255, 2012.

KANWAR, J.R.; SUN, X.; PUNJ, V.; SRIRAMOJU, B.; MOHAN, R.R.; ZHOU, S.-F.; CHAUHAN, A.; KANWAR, R.K. Nanoparticles in the treatment and diagnosis of neurological disorders: untamed dragon with fire power to heal. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v.8, n.4, p.399-414, 2012.

KARAMAC, M.; KOSINSKA, A.; PEGG, R.B. Content of gallic acid in selected plant extracts. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v.15/56, n.1, p.55-58, 2006.

KHURROO, T.; VERMA, D.; TALEGAONKAR, S.; PADHI, S.; PANDA, A.K.; IQBAL, Z. Topotecan–tamoxifen duple PLGA polymeric nanoparticles: Investigation of *in vitro*, *in vivo* and cellular uptake potential. **International Journal of Pharmaceutics**, v.473, n.1-2, p.384-394, 2014.

KIM, J.H.; LEE, B.K.; LEE, K.W.; LEE, H.J. Resveratrol counteracts gallic acid-induced down-regulation of gap-junction intercellular communication. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.20, n.3, p.149-154, 2009.

KISS, É.; GYULAI, G.; PÉNZES, C.B.; IDEI, M.; HORVÁTI, K.; BACSA, B.; BOSZE, S. Tuneable surface modification of PLGA nanoparticles carrying newantitubercular drug candidate. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.458, p.178-186, 2014.

KLAJNERT, B.; BRYSEWSKA, M. Interactions between PAMAM dendrimers and gallic acid molecules studied by spectrofluorimetric methods. **Bioelectrochemistry**, v.70, n.1, p.50-52, 2007.

KOO, O.M.; RUBINSTEIN, I.; ONYUKSEL, H. Role of nanotechnology in targeted drug delivery and imaging: a concise review. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v.1, n.3, p.193-212, 2005.

KREUTER, J. Drug delivery to the central nervous system by polymeric nanoparticles: What do we know? **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.71, p.2-14, 2014.

KUMARI, A.; YADAV, S.K.; YADAV, S.C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.75, n.1, p.1-18, 2010.

LIU, J.; LU, J.-F.; KAN, J.; JIN, C.-H. Synthesis of chitosan-gallic acid conjugate: Structure characterization and *in vitro* anti-diabetic potential. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.62, p.321-329, 2013.

LOCATELLI, C.; LEAL, P.C.; YUNES, R.A.; NUNES, R.J.; CRECZYNSKI-PASA, T.B. Gallic acid ester derivatives induce apoptosis and cell adhesion inhibition in melanoma cells: The relationship between free radical generation, glutathione depletion and cell death. **Chemico-Biological Interactions**, v.181, n.2, p.175-184, 2009.

LU, Z.; NIE, G.; BELTON, P.S.; TANG, H.; ZHAO, B. Structure–activity relationship analysis of antioxidant ability and neuroprotective effect of gallic acid derivatives. **Neurochemistry International**, v.48, n.4, p.263-274, 2006.

MAINARDES, R.M.; EVANGELISTA, R.C. PLGA nanoparticles containing praziquantel: effect of formulation variables on size distribution. **International Journal of Pharmaceutics**, v.290, n.1-2, p.137-144, 2005.

MANSOURI(a), M.T.; NAGHIZADEH, B.; GHORBANZADEH, B.; FARBOOD, Y.; SARKAKI, A.; BAVARSAD, K. Gallic acid prevents memory deficits and oxidative stress induced by intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.111, p.90-96, 2013.

MANSOURI(b), M.T.; FARBOOD, Y.; SAMERI, M.J.; SARKAKI, A.; NAGHIZADEH, B.; RAFEIRAD, M. Neuroprotective effects of oral gallic acid against oxidative stress induced by 6-hydroxydopamine in rats. **Food Chemistry**, v.138, n.2-3, p.1028-1033, 2013.

MASOUD, M.S.; HAGAGG, S.S.; ALI, A.E.; NASR, N.M. Synthesis and spectroscopic characterization of gallic acid and some of its azo complexes. **Journal of Molecular Structure**, v.1014, p.17-25, 2012.

MEI, L.; ZHANG, Z.; ZHAO, L.; HUANG, L.; YANG, X.-L.; TANG, J.; FENG, S.-S. Pharmaceutical nanotechnology for oral delivery of anticancer drugs. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.65, n.6, p.880-890, 2013.

MITTAL, G.; CARSWELL, H.; BRETT, R.; CURRIE, S.; KUMAR M.N.V.R. Development and evaluation of polymer nanoparticles for oral delivery of estradiol to rat brain in a model of Alzheimer's pathology. **Journal of Controlled Release**, v.150, n.2, p.220-228, 2011.

MO, L.; HOU, L.; GUO, D.; XIAO, X.; MAO, P.; YANG, X. Preparation and characterization of teniposide PLGA nanoparticles and their uptake in human glioblastoma U87MG cells. **International Journal of Pharmaceutics**, v.436, n.1-2, p.815-824, 2012.

MODI, G.; PILLAY, V.; CHOONARA, Y.E.; NDESENDO, V.M.K.; TOIT, L.C.; NAIDOO, D. Nanotechnological applications for the treatment of neurodegenerative disorders. **Progress in Neurobiology**, v.88, n.4, p.272-285, 2009.

MONTESINOS, R.N.; BÉDUNEAU, A.; PELLEQUER, Y.; LAMPRECHT, A. Delivery of P-glycoprotein substrates using chemosensitizers and nanotechnology for selective and efficient therapeutic outcomes. **Journal of Controlled Release**, v.161, n.1, p.50-61, 2012.

MORENO-ÁLVAREZ, S.A.; MARTÍNEZ-CASTANÓN, G.A.; NINO-MARTÍNEZ, N.; REYES-MACÍAS, J.F.; PATINO-MARÍN, N.; LOYOLA-RODRÍGUEZ, J.P.; RUIZ, F. Preparation and bactericide activity of gallic acid stabilized gold nanoparticles. **Journal of Nanoparticle Research**, v.12, n.8, p.2741-2746, 2010.

MUSYANOVYCH, A.; SCHMITZ-WIENKE, J.; MAILÄNDER, V.; WALTHER, P.; LANDFESTER, K. Preparation of biodegradable polymer nanoparticles by miniemulsion technique and their cell interactions. **Macromolecular Biosciences**, v.8, n.2, p.127-139, 2008.

NAAHIDI, S.; JAFARI, M.; EDALAT, F.; RAYMOND, K.; KHADEMHOSEINI, A.; CHEN, P. Biocompatibility of engineered nanoparticles for drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v.166, n.2, p.182-194, 2013.

NABAVI, S.F.; HABTEMARIAM, S.; JAFARI, M.; SUREDA, A.; NABAVI, S.M. Protective role of gallic acid on sodium fluoride induced oxidative stress in rat brain. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.89, n.1, p.73-77, 2012.

NAGPAL, K.; SINGH, S.K.; MISHRA, D.N. Optimization of brain targeted gallic acid nanoparticles for improved antianxiety-like activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.57, p.83-91, 2013.

NATH, S.D.; SON, S.; SADIASA, A.; MIN, Y.K.; LEE, B.T. Preparation and characterization of PLGA microspheres by the electrospraying method for delivering simvastatin for bone regeneration. **International Journal of Pharmaceutics**, v.443, n.1-2, p.87-94, 2013.

NGUYEN, D.-M.-C.; SEO, D.-J.; LEE, H.-B.; KIM, I.-S.; KIM, K.-Y.; PARK, R.-D.; JUNG, W.-J. Antifungal activity of gallic acid purified from *Terminalia nigrovenulosa* bark against *Fusarium solani*. **Microbial Pathogenesis**, v.56, p.8-15, 2013.

NIHO, N.; SHIBUTANI, M.; TAMURA, T.; TOYODA, K.; UNEYAMA, C.; TAKAHASHI, N.; HIROSE, M. Subchronic toxicity study of gallic acid by oral administration in F344 rats. **Food and Chemical Toxicology**, v.39, n.11, p.1063-70, 2001.

NUNES, A.; AL-JAMAL, K.T.; KOSTARELOS, K. Therapeutics, imaging and toxicity of nanomaterials in the central nervous system. **Journal of Controlled Release**, v.161, n.2, p.290-306, 2012.

OWENS III, D.E.; PEPPAS, N.A. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v.307, n.1, p.93-102, 2006.

PAL, C.; BINDU, S.; DEY, S.; ALAM, A.; GOYAL, M.; IQBAL, M.S.; MAITY, P.; ADHIKARI, S.S.; BANDYOPADHYAY, U. Gallic acid prevents nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced gastropathy in rat by blocking oxidative stress and apoptosis. **Free Radical Biology & Medicine**, v.49, n.2, p.258-267, 2010.

PARDESHI, S.; DHODAPKAR, R.; KUMAR, A. Molecularly imprinted microspheres and nanoparticles prepared using precipitation polymerisation method for selective extraction of gallic acid from *Emblica officinalis*. **Food Chemistry**, v.146, p.385-393, 2014.

PARVEEN, S.; MISRA, R.; SAHOO, S.K. Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v.8, n.2, p.147-166, 2012.

PORTA, G.D.; CAMPARDELLIA, R.; REVERCHON, E. Monodisperse biopolymer nanoparticles by continuous supercritical emulsion extraction. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.76, p.67-73, 2013.

PRISCILLA, D.H.; PRINCE, P.S.M. Cardioprotective effect of gallic acid on cardiac troponin-T, cardiac marker enzymes, lipid peroxidation products and antioxidants in experimentally induced myocardial infarction in Wistar rats. **Chemico-Biological Interactions**, v.179, n.2-3, p.118-124, 2009.

PUNITHAVATHI(a), V.R.; PRINCE, P.S.M.; KUMAR, M.R.; SELVAKUMARI, C.J. Protective effects of gallic acid on hepatic lipid peroxide metabolism, glycoprotein components and lipids in streptozotocin-induced type II diabetic Wistar rats. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**. v.25, n.2, p.68-76, 2011.

PUNITHAVATHI(b), V.R.; PRINCE, P.S.M.; KUMAR, R.; SELVAKUMARI, J. Antihyperglycaemic, antilipid peroxidative and antioxidant effects of gallic acid on streptozotocin induced diabetic Wistar rats. **European Journal of Pharmacology**, v.650, n.1, p.465-471, 2011.

RAO, J.P.; GECKELER, K.E. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. **Progress in Polymer Science**, v.36, p.887-913, 2011.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v.26, n.9-10, p.1231-1237, 1999.

REDDY, T.C.; REDDY, D.B.; APARNA A.; ARUNASREE, K.M.; GUPTA, G.; ACHARI, C.; REDDY, G.V.; LAKSHMIPATHI, V.; SUBRAMANYAM, A.; REDDANNA, P. Anti-leukemic effects of gallic acid on human leukemia K562 cells: Downregulation of COX-2, inhibition of BCR/ABL kinase and NF-Kb inactivation. **Toxicology in Vitro**, p.26, n.3, p.396-405, 2012.

RIBEIRO, S.; RIJKEMA, S.G.; DURRANI, Z.; FLORENCE, A.T. PLGA-dendron nanoparticles enhance immunogenicity but not lethal antibody production of a DNA vaccine against anthrax in mice. **International Journal of Pharmaceutics**, v.331, n.2, p.228-232, 2007.

RITGER, P.L.; PEPPAS, N.A. A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices. **Journal of Controlled Release**, v.5, n.1, p.37-42, 1987.

ROSA, C.G.; BORGES, C.D.; ZAMBIAZI, R.C.; NUNES, M.R.; BENVENUTTI, E.V.; LUZA, S.R.; D'AVILAA, R.F.; RUTZA, J.K. Microencapsulation of gallic acid in chitosan, β -cyclodextrin and xanthan. **Industrial Crops and Products**, v.46, p.138-146, 2013.

SAHOO, S.K.; PARVEEN, S.; PANDA, J.J. The present and future of nanotechnology in human health care. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v.3, n.1, p.20-31, 2007.

SANCHEZ, F.; SOBOLEV, K. Nanotechnology in concrete – A review. **Construction and Building Materials**, v.24, n.11, p.2060-2071, 2010.

SAWANT, L.; PRABHAKAR, B.; PANDITA, N. Quantitative HPLC analysis of ascorbic acid and gallic acid in *Phyllanthus Emblica*. **Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques**, v.1, n.3, p.111, 2010.

SCHAFFAZICK, S.R.; GUTERRES, S.S.; FREITAS, L.L.; POHLMANN, A.R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v.26, n.5, p.726-737, 2003.

SHAHRZAD, S.; AOYAGI, K.; WINTER, A.; KOYAMA, A.; BITSCH, I. Pharmacokinetics of gallic acid and its relative bioavailability from tea in healthy humans. **The Journal of Nutrition**, v.131, n.4, p.1207-1210, 2001.

SHENG, Y.-X.; LI, L.; WANG, Q.; GUO, H.-Z.; GUO, D.-A. Simultaneous determination of gallic acid, albiflorin, paeoniflorin, ferulic acid and benzoic acid in Si–Wu decoction by high-performance liquid chromatography DAD method. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.37, n.4, p.805-810, 2005.

SIEPMANN, J.; PEPPAS, N.A. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.48, n.2-3, p.139-157, 2001.

SILVA, C.; MARTINI, E.; TAVARES, G.; SILVEIRA, T.; OLIVEIRA, M.C.; TEIXEIRA, H. Caracterização físico-química de nanoemulsões catiônicas como sistemas de liberação de oligonucleotídeos. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v.25, n.1, p.17-21, 2006.

SILVA, L.M.; HILL, L.A.; FIGUEIREDO, E.; GOMES, C.L. Delivery of phytochemicals of tropical fruit by-products using poly (DL-lactide-co-glycolide) (PLGA) nanoparticles: Synthesis, characterization, and antimicrobial activity. **Food Chemistry**, v.165, p.362-370, 2014.

SON, S.; LEE, W.R.; JOUNG, Y.K.; KWON, M.H.; KIM, Y.S.; PARK, K.D. Optimized stability retention of a monoclonal antibody in the PLGA nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v.368, n.1-2, p.178-185, 2009.

SONAM, H.C.; KUMAR, V. Taguchi design for optimization and development of antibacterial drug-loaded PLGA nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.64, p.99-105, 2014.

SONG, X.; ZHAO, Y.; WU, W.; BI, Y.; CAI, Z.; CHEN, Q.; LI, Y.; HOU, S. PLGA nanoparticles simultaneously loaded with vincristine sulfate and verapamil hydrochloride: Systematic study of particle size and drug entrapment efficiency. **International Journal of Pharmaceutics**, v.350, n.1-2, p.320-329, 2008.

SOSNIK, A.; CARCABOSO, A.M.; GLISONI, R.J.; MORETTON, M.A.; CHIAPPETTA, D.A. New old challenges in tuberculosis: Potentially effective nanotechnologies in drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.62, n.4-5, p.547-549, 2010.

STEVANOVIC, M.; BRACKO, I.; MILENKOVIC, M.; FILIPOVIC, N.; NUNIC, J.; FILIPIC, M.; USKOKOVIC, D.P. Multifunctional PLGA particles containing poly(L-glutamic acid)-capped silver nanoparticles and ascorbic acid with simultaneous antioxidative and prolonged antimicrobial activity. **Acta Biomaterialia**, v.10, n.1, p.151-162, 2014.

SUN, W.; XIE, C.; WANG, H.; HU, Y. Specific role of polysorbate 80 coating on the targeting of nanoparticles to the brain. **Biomaterials**, v.25, n.15, p.3065-3071, 2004.

TORRADO, J.J.; BALLESTEROS, M.P.; RIVAS, G.; ALFONSO, C.; VALDESPINA, S.; ESPADA, R. Effect of aggregation state on the toxicity of different amphotericin B preparations. **International Journal of Pharmaceutics**, v.361, n.1-2, p.64-69, 2008.

TUNG, Y.-T.; WU, J.-H.; HUANG, C.-C.; PENG, H.-C.; CHEN, Y.-L.; YANG, S.-C.; CHANG, S.-T. Protective effect of *Acacia confusa* bark extract and its active compound

gallic acid against carbon tetrachloride-induced chronic liver injury in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v.47, n.6, p.1385-1392, 2009.

UMADEVI, S.; GOPI, V.; SIMNA, S.P.; PARTHASARATHY, A.; YOUSUF, S.M.J.; ELANGO VAN, V. Studies on the cardio protective role of gallic acid against AGE-induced cell proliferation and oxidative stress in H9C2 (2-1) cells. **Cardiovascular Toxicology**, v.12, n.4, p.304-311, 2012.

VANDERHOFF, J.W.; EL-AASSER, M.S.; UGELSTAD, J. Polymer emulsification process. **U.S. Patent**, 4,177, 177, 1979.

VARSHOCHIAN, R.; JEDDI-TEHRANI, M.; MAHMOUDI, A.R.; KHOSHAYAND, M.R.; ATYABI, F.; SABZEVARI, A.; ESFAHANI, M.R.; DINARVAND, R. The protective effect of albumin on bevacizumab activity and stability in PLGA nanoparticles intended for retinal and choroidal neovascularization treatments. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.50, n.3-4, p.341-352, 2013.

VERMA, S.; SINGH, A.; MISHRA, A. Gallic acid: Molecular rival of cancer. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.35, n.3, p.473-485, 2013.

VO, T.-S.; NGO, D.-H.; KIM, S.-K. Gallic acid-grafted chitooligosaccharides suppress antigen-induced allergic reactions in RBL-2H3 mast cells. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.47, n.2, p.527-533, 2012.

VOIGT, N.; HENRICH-NOACK, P.; KOCKENTIEDT, S.; HINTZ, W.; TOMAS, J.; SABEL, B.A. Surfactants, not size or zeta-potential influence blood–brain barrier passage of polymeric nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.87, n.1, p.19-29, 2014.

WANG X.-Q.; ZHANG, Q. pH-sensitive polymeric nanoparticles to improve oral bioavailability of peptide/protein drugs and poorly water-soluble drugs. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.82, n.2, p.219-229, 2012.

WANG, C.-X.; HUANG, L.-S.; HOU, L.-B.; JIANG, L.; YAN, Z.-T.; WANG, Y.-L.; CHEN, Z.-L. Antitumor effects of polysorbate-80 coated gemcitabine polybutylcyanoacrylate nanoparticles *in vitro* and its pharmacodynamics *in vivo* on C6 glioma cells of a brain tumor model. **Brain Research**, v.1261, p.91-99, 2009.

WANG, L.; HALQUIST, M.S.; SWEET, D.H. Simultaneous determination of gallic acid and gentisic acid in organic anion transporter expressing cells by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v.937, p.91-96, 2013.

WANG, M.; THANOU, M. Targeting nanoparticles to cancer. **Pharmacological Research**, v.62, n.2, p.90-99, 2010.

WILSON, B.; SAMANTA, M.K.; SANTHI, K.; KUMAR, K.P.S.; PARAMAKRISHNAN, N.; SURESH, B. Poly(n-butylcyanoacrylate) nanoparticles coated with polysorbate 80 for the targeted delivery of rivastigmine into the brain to treat Alzheimer's disease. **Brain Research**, v.1200, p.159-168, 2008.

WOHLFART, S.; GELPERINA, S.; KREUTER, J. Transport of drugs across the blood-brain barrier by nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v.161, n.2, p.264-273, 2012.

WONG, H.L.; WU, X.Y.; BENDAYAN, R. Nanotechnological advances for the delivery of CNS therapeutics. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.64, n.7, p.686-700, 2012.

XIE, S.W.; WANG, S.L.; ZHAO, B.K.; HAN, C.; WANG, M.; ZHOU, W.Z. Effect of PLGA as a polymeric emulsifier on preparation of hydrophilic protein-loaded solid lipid nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.67, n.2, p.199-204, 2008.

YANG, J.; LEE, E.; KU, M.; HUH, Y.-M.; CHEONG, J-H. Functional nanoplatfoms for enhancement of chemotherapeutic index. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v.13, n.2, p.212-221, 2013.

YEN, G.-C.; DUH, P.-D.; TSAI, H.-L. Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid. **Food Chemistry**, v.79, n.3, p.307-313, 2002.

YOON, C.-H.; CHUNG, S.-J.; LEE, S.-W.; PARK, Y.-B.; LEE, S.-K.; PARK, M.-C. Gallic acid, a natural polyphenolic acid, induces apoptosis and inhibits proinflammatory gene expressions in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. **Joint Bone Spine**, v.80, n.3, p.274-279, 2013.

YOU, B.R.; PARK, W.H. The effects of mitogen-activated protein kinase inhibitors or small interfering RNAs on gallic acid-induced HeLa cell death in relation to reactive oxygen species and glutathione. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.59, n.2, p.763-771, 2011.

YU, S.-H.; MI, F.-L.; PANG, J.-C.; JIANG, S.-C.; KUO, T.-H.; WU, S.-J.; SHYU, S.-S. Preparation and characterization of radical and pH-responsive chitosan-gallic acid conjugate drug carriers. **Carbohydrate Polymers**, p.84, n.2, p.794-802, 2011.

ZAKERI-MILANI, P.; LOVEYMI, B.D.; JELVEHGARI, M.; VALIZADEH, H. The characteristics and improved intestinal permeability of vancomycin PLGA-nanoparticles as

colloidal drug delivery system. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.103, p.174-181, 2013.

ZHANG, X.; FERRARIS, S.; PRENESTI, E.; VERNÉ, E. Surface functionalization of bioactive glasses with natural molecules of biological significance, part I: Gallic acid as model molecule. **Applied Surface Science**, v.287, p.329-340, 2013.

ZHOU, F.; ZHOU, R.; HAO, X.; WU, X.; RAO, W.; CHEN, Y.; GAO, D. Influences of surfactant (PVA) concentration and pH on the preparation of copper nanoparticles by electron beam irradiation. **Radiation Physics and Chemistry**, v.77, n.2, p.169-173, 2008.

ANEXO 1

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO OESTE - UNICENTRO 

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS CONTENDO ÁCIDO GÁLICO

Pesquisador: Aline de Cristo Soares Alves

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 19749813.0.0000.0108

Instituição Proponente: Universidade Estadual do Centro Oeste - UNICENTRO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 501.330

Data da Relatoria: 17/12/2013

Apresentação do Projeto:

A pesquisa da mestranda Aline de Cristo Soares Alves, intitulado DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS CONTENDO ÁCIDO GÁLICO é um projeto experimental "in vitro" que comparará a toxicidade celular frente a hemácias humanas do composto ácido gálico isolado e formulado em nanopartículas poliméricas. A pesquisa será realizada através da análise de amostras de sangue de voluntários saudáveis, para o desenvolvimento tecnológico de nanopartículas poliméricas contendo AG, para a melhora da biodisponibilidade oral, diminuição de efeitos tóxicos e melhora da eficiência terapêutica no tratamento contra o câncer.

Objetivo da Pesquisa:

Primário: Desenvolvimento tecnológico de nanopartículas poliméricas contendo AG, para a melhora da biodisponibilidade oral, diminuição de efeitos tóxicos e melhora da eficiência terapêutica.

Secundário: Avaliação da citotoxicidade ex vivo sobre hemácias humanas das nanopartículas contendo AG e do AG isolado.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos e benefícios são descritos no projeto, detalhando-se como ocorrerá a coleta de sangue dos participantes, no laboratório de Bioquímica Clínica da UNICENTRO, onde serão tomados todos

Endereço: Rua Simeão Camargo Varela de Sá, 03 - Campus CEDETEG - (ao lado do Departamento de Nutrição)
 Bairro: Vila Carlí CEP: 85.040-080
 UF: PR Município: GUARAPUAVA
 Telefone: (42)3629-8177 Fax: (42)3629-8100 E-mail: comep_unicentro@yahoo.com.br

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO OESTE - UNICENTRO 

Continuação do Parecer: 501.330

os devidos cuidados. A pesquisadora descreve que serão adotados procedimentos que minimizem os efeitos da picada, no caso de formação de abscesso cutâneo, e que pode ocorrer estresse mínimo ao paciente pela introdução da agulha.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa está redigida de acordo com os critérios acadêmicos e científicos e com grande aplicabilidade para a saúde pública. Apresenta revisão de literatura sucinta e adequada aos propósitos do estudo.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A folha de rosto está apresentada e de acordo com o solicitado. O TCLE está em forma de convite, e apresenta os possíveis riscos relativos à coleta de sangue. A carta de autorização para execução da pesquisa é assinada pelo coordenador do Laboratório de Nanotecnologia da UNICENTRO, redigida em papel timbrado. O cronograma e o orçamento (com recursos próprios) estão devidamente preenchidos.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não se aplica.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

PROJETO APROVADO

Em atendimento à Resolução CNS/MS- 466/2012, deverá ser encaminhado ao CEP o relatório parcial assim que tenha transcorrido um ano da pesquisa e relatório final em até trinta dias após o término da pesquisa.

Qualquer alteração no projeto deverá ser encaminhada para análise deste comitê.

Endereço: Rua Simeão Camargo Varela de Sá, 03 - Campus CEDETEG - (ao lado do Departamento de Nutrição)
 Bairro: Vila Carlí CEP: 85.040-080
 UF: PR Município: GUARAPUAVA
 Telefone: (42)3629-8177 Fax: (42)3629-8100 E-mail: comep_unicentro@yahoo.com.br

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO
CENTRO OESTE - UNICENTRO 

Continuação do Parecer: 501.330

GUARAPUAVA, 19 de Dezembro de 2013

Assinador por:
Maria Emilia Marcondes Barbosa
(Coordenador)

Endereço: Rua Simeão Camargo Varela de Sá, 03 - Campus CEDETEG - (ao lado do Departamento de Nutrição)
Bairro: Vila Carlí **CEP:** 85.040-080
UF: PR **Município:** GUARAPUAVA
Telefone: (42)3629-8177 **Fax:** (42)3629-8100 **E-mail:** comep_unicentro@yahoo.com.br